








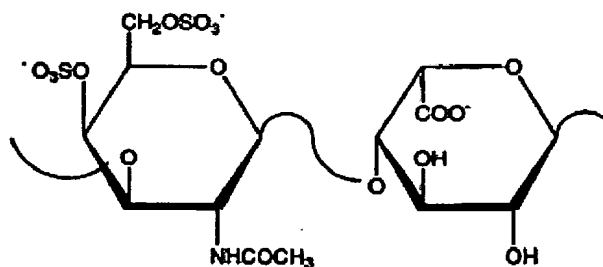


DERMATAN DISULFATE, AN INHIBITOR OF THROMBIN GENERATION AND COMPLEMENT ACTIVATION**Publication number:** WO9834959**Publication date:** 1998-08-13**Inventor:** VAN GORP CORNELIUS L; BRISTER STEPHANIE J;
BUCHANAN MICHAEL R; LINHARDT ROBERT J**Applicant:** DERMATAN PRODUCTS, LIMITED (US)**Classification:****- international:** A61K31/737; A61L33/08; A61P7/02; A61P9/00;
A61P29/00; A61P43/00; C08B37/00; A61K31/737;
A61L33/00; A61P7/00; A61P9/00; A61P29/00;
A61P43/00; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/00;
A61K31/725; A61L33/00; C08B37/08**- european:** A61K31/737; A61L33/08; C08B37/00P2D**Application number:** WO1997US11750 19970703**Priority number(s):** US19970795099 19970206**Also published as:** EP0983304 (A1)
 EP0983304 (A0)
 CA2279535 (A1)
 EP0983304 (B1)
 DE69733493T (T2)

more >>

Cited documents: FR2584728
 DE3124384
 EP0554898
 XP002047412[Report a data error here](#)**Abstract of WO9834959**

A method of inhibiting thrombin generation and complement activation is inhibited by using a dermatan disulfate having at least 2 sulfate groups per disaccharide obtained by chemical sulfation of native dermatan sulfate. The resulting dermatan disulfate having an average molecular weight from about 5000 to 35000 Daltons is characterized by high content (i) a high content of L-iduronic->4,6 di-O-sulfated-N-acetyl-D-galactosamine residues and (ii) a specific heparin cofactor II-mediated antithrombin activity, depending on average molecular weight, between about 25 to 125 u/mg.

**Dermatan Disulfate DDS**

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公表特許公報 (A) (11) 特許出願公表番号
特表2003-512807
(P2003-512807A)
(43) 公表日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	チーコード (参考)
C 08 B 37/00		C 08 B 37/00	G
A 61 K 31/737		A 61 K 31/737	
A 61 P 7/02		A 61 P 7/02	
	9/00	9/00	
	29/00	29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-534304	(71) 出願人	デルマトン プロダクツ リミテッド
(86) (22) 出願日	平成9年7月3日(1997.7.3)		アメリカ合衆国、45246-4846 オハイオ、
(85) 翻訳文提出日	平成11年8月3日(1999.8.3)		シンシナチー、インダナショナル プール
(86) 国際出願番号	PCT/US97/111750		バーード 10170
(87) 国際公開番号	WO98/034959	(72) 発明者	バン ゴーブ、コーネリアス エル、
(87) 国際公開日	平成10年8月13日(1998.8.13)		アメリカ合衆国、45066 オハイオ、スプ
(31) 優先権主張番号	08/795,099		リングボロ、ポイント オウツズ 8439
(32) 優先日	平成9年2月6日(1997.2.6)	(72) 発明者	プリスター、スチファニー ジェイ、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国、エルビイ 3ゼット2、オン
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, J P, MX		タリオ、ハミルトン、ケント ストリート 151
(74) 代理人	井理士 三宅 正夫		

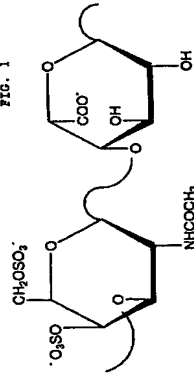
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デルマトン二硫酸、トロンピン生成および細胞活性化阻害剤

(57) 【要約】

トロンピン生成および細胞活性化を阻害する方法は、天然デルマトン二硫酸の化学的硫酸化により得られる二硫酸当り少なくとも2の硫酸基を有するデルマトン二硫酸を使用し得る。得られた、約5000から35000ダルトンの平均分子量を有するデルマトン二硫酸は (i) L-イソズロン>4,6-ジ-O-硫酸化-N-アセチル-D-ガラクトサミン残基の高含量および (ii) 平均分子量に依存する、約25と約125u/mgの間の特定のヘパリン結合子11種介トロンピン活性の高含量によって特徴づけられる。

FIG. 1



デルマトン 二硫酸 D D S

【特許請求の範囲】

1. 二硫酸当り少なくとも2の硫酸基を有するL-イソズロン酸→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二硫酸単位を繰返しからなるデルマトン二硫酸。

2. デルマトン二硫酸は陽イオン対イオンを有し、該陽イオン対イオンはナトリウムであり、そして銅、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛イオンがデルマトン二硫酸のマイクログラム当り1000ナノモル未満である請求項1記載のデルマトン二硫酸。

3. 該陽イオン対イオンがアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、カリウム、および亜鉛からなる群より選択されたものである請求項2記載のデルマトン二硫酸。

4. 組成物が天然のデルマトン二硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項1記載のデルマトン二硫酸。

5. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項1記載のデルマトン二硫酸。

6. デルマトン二硫酸が精製した天然起源のものより単離されたものである請求項1記載のデルマトン二硫酸。

7. 組成物がデルマトン二硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項1記載のデルマトン二硫酸。

8. トロンピン生成の阻害に対して治療を必要とする患者に、二硫酸当り少なくとも2の硫酸基を有するL-イソズロン酸→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二硫酸単位を繰返しからなるデルマトン二硫酸の医薬としての有効量を含有

する組成物を投与することからなるトロンピンの生成を阻害する方法。

9. 投与されるデルマトン二硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンの間である請求項8記載の方法。

10. 該デルマトン二硫酸が、約25と約125u/mgの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項8記載の方法。

11. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムであり、銅、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛イオンの量がデルマタン硫酸のマイクログラム当り1000ナノモル以下であることよりなる請求項8記載の方法。

12. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがアンモニウム、カルシウム、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された請求項11記載の方法。

13. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項8記載の方法。

14. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項8記載の方法

15. デルマタン硫酸が精製した天然起源のものより単離されたものである請求項8記載の方法。

16. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項8記載の方法。

17. 投与工程が更に該組成物をin vivoで投与することを含む請求項8記載の方法。

18. 投与工程が更に該組成物を経口的に投与することを含む請求項8記載の方法。

19. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求項8記載の方法

20. 補体活性化の阻害に対して治療を必要とする患者に、二糖類当り少なくとも2の硫酸基を有するL-イズロン酸->4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しからなるデルマタン硫酸の医薬としての有効量を含有する組成物を投与することからなる補体活性化を阻害する方法

21. 投与されるデルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンの間である請求項20記載の方法。

22. 該デルマタン硫酸が、約25と約125u/mgの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項20記載の方法。

23. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムであり、銅、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛イオンの量がデルマタン硫酸のマイクログラム当り1000ナノモル未満であることよりなる請求項20記載の方法。

24. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがアンモニウム、カルシウム、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された請求項23記載の方法。

25. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項20記載の方法。

26. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項20記載の方法

27. デルマタン硫酸が精製した天然起源のものより単離され

たものである請求項20記載の方法。

28. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項20記載の方法。

29. 投与工程が更に該組成物をin vivoで投与することを含む請求項20記載の方法。

30. 投与工程が更に該組成物を経口的に投与することを含む請求項20記載の方法。

31. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求項20記載の方法。

32. デルマタン硫酸の第四級アンモニウム塩を調製し；そして該デルマタン硫酸第四級アンモニウム塩を血液と相互作用する人工材料の表面に固定化する；ことよりなる血液相互作用人工材料を調製する方法。

33. デルマタン硫酸が二糖類当り少なくとも2の硫酸基を有するL-イズロン酸->4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しからなるものである請求項32記載の方法。

34. 投与されるデルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンの間である請求項32記載の方法。

35. 該デルマタン硫酸が、約25と約125u/mgの間の範囲内の抗IIa活性

125 25 25

を有している請求項 3 2 記載の方法。

3 6. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項 3 2 記載の方法。

3 7. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求

項 3 2 記載の方法。

3 8. デルマタン硫酸が精製した天然起源のものより分離されたものである請求項 3 2 記載の方法。

3 9. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項 3 2 記載の方法。

4 0. 新しく形成したアルデヒド基を有するデルマタン硫酸を調製し；そして新しく形成したアルデヒド基を有する該デルマタン硫酸を血流と相互作用する人工材料の表面に共有結合で固定化することよりなる：血液相互作用人工材料の調製方法。

4 1. 新しく形成したアルデヒド基がデルマタン硫酸の過ヨウ素硫酸化により得られることよりなる請求項 4 0 記載の方法。

4 2. デルマタン硫酸が二糖類当たり少なくとも 2 の硫酸基を有する L-イソロン酸->4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しからなるものである請求項 4 0 記載の方法。

4 3. 新しく形成したアルデヒド基を有するデルマタン硫酸を調製するために使用されるデルマタン硫酸の平均分子量が約 5,000 と約 30,000 ダルトンの間である請求項 4 0 記載の方法。

4 4. 新しく形成したアルデヒド基を有するデルマタン硫酸を調製するために使用される該デルマタン硫酸が、約 25 と約 125 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の間の範囲内の抗 IIa 活性を有している請求項 4 0 記載の方法。

4 5. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項 4 0 記載の方法。

4 6. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項 4 0 記載の方

法。

4 7. デルマタン硫酸が天然起源のものより分離されそして精製されたものである請求項 4 0 記載の方法。

4 8. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項 4 0 記載の方法。

4 9. トロンビン阻害を必要とする血液に、二糖類当たり少なくとも 2 の硫酸基を有する L-イソロン酸->4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しからなるデルマタン硫酸の有効量を投与することからなるトロンビンの生成を阻害する方法。

5 0. 血液が血液生成組織である請求項 4 9 記載の方法。

5 1. 投与されるデルマタン硫酸の平均分子量が約 5,000 と約 30,000 ダルトンの間である請求項 4 9 記載の方法。

5 2. 該デルマタン硫酸が、約 25 と約 125 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の間の範囲内の抗 IIa 活性を有している請求項 4 9 記載の方法。

5 3. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムであり、銅、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛イオンの量がデルマタン硫酸のマイクログラム当たり 1000 ナノモル以下であることよりなる請求項 4 9 記載の方法。

5 4. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがアンモニウム、カルシウム、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された請求項 5 3 記載の方法。

5 5. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調

製されたものである請求項 4 9 記載の方法。

5 6. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項 4 9 記載の方法。

5 7. デルマタン硫酸が精製した天然起源のものより分離されたものである請求項 4 9 記載の方法。

5 8. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項 4 9 記載の方法。

5 9. 補体活性化の阻害に対して治療を必要とする患者に、二糖類当たり少な

載の方法。

くとも2の硫酸基を有する1-イズロン糖→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖単位を繰返しからなるデルマタン硫酸の医薬としての有効量を含有する組成物を投与することからなる；内皮および動脈血管の種々の型に対する過剰の炎症性繊維増殖反応を阻害する方法。

60. 投与されるデルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンの間である請求項60記載の方法。

61. 該デルマタン硫酸が、約25と約125u/mgの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項59記載の方法。

62. 陽イオン対イオンがナトリウムであり、銅、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛イオンの量が化合物のマイクロモル当り1000ナノモル以下であることよりなる請求項59記載の方法。

63. 陽イオン対イオンがアンモニウム、カルシウム、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された請求項62記載の方法。

64. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項59記載の方法。

65. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項59記載の方法。

66. デルマタン硫酸が精製した天然起源のものより単離されたものである請求項59記載の方法。

67. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により該組成物を精製する工程を更に含む請求項59記載の方法。

68. 投与工程が更に該組成物をin vivoで投与することを含む請求項59記載の方法。

69. 投与工程が更に該組成物を非経口的に投与することを含む請求項59記載の方法。

70. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求項59記載の方法。

71. 投与工程が更に該組成物をex vivoで投与することを含む請求項59記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、抗トロンピンII(依存性、ヘパリン補助因子II (以下HCII) 仲介トロンピン生成阻害、ならびに補体活性化の代表的、古典的および末梢経路の阻害)に関する；特に本発明はトロンピン生成および補体活性化を阻害する主として二硫酸化二糖類デルマタン類からなる化学的に硫酸化されたデルマタン硫酸に關する。

発明の背景

深部静脈血栓症 (以下DVT) あるいは破滅血管平滑筋細胞 (以下VSMC) 増殖のようなトロンピンの過剰生成により特徴づけられる状態または疾病は生命の危険をもたらす効果的な治療が必要となる。外傷は血管の損傷とVSMC増殖の両者をもたらす、血管の狭窄、再狭窄および過形成、ならびに血液凝固の活性化を引き起こす。血管狭窄、過形成および血液凝固の活性化は、血管移植手術、心臓移植、バルーンまたはレーザー血管造影法、動脈外傷性損傷、筋性動脈の術後再生、動脈カテーテルの長期間留置、侵襲性の動脈診断手段、腎、肺または肝臓移植、あるいはバイパス手術処置の後起こると生命に危険となり得る。

DVTは、例えば、一つの生命に危険を及ぼす合併症、肺塞栓症 (以下PE) の前に、しばしば起こる。大多数のPEs、そして特に大多数の肺見PEsは無症候性DVTを引き起こす。疫学的データは、各年のDVTの比率は一般人100,000人当り

約160であり、肺見PEsの率は100,000人当り約60であることを示している。それゆえ、医療関係者はDVTの治療と、その合併症の予防に努力しているのである。理想的には、DVTを充分に治療することにより、PE、血栓の延長、静脈壊疽および敗の喪失、血栓症の症状再発、重症血栓症後症候群、および軽度増加により生じる有痛性胫腓部に基く脚の進行性腫脹、を予防することができるとができる。

問題の深刻さの例として、選択的外科手術のある種のものを受ける患者は術後静脈血栓阻害症を発現するハイリスクがある。術前予防を行わないと、DVTの

、多分50%より高い、高発生率において、全麻閉鎖置換術に、必然的に高い率でPEを伴うことが知られている。しかしながら、一般的に、抗凝固剤、および特にヘパリンは、一般的外科手術患者においてDVTおよび致命的なPEを減少することができるので、抗凝固剤はDVTの治療において、罹患率および死亡率の予防に効果的である。(ヨーロッパコンセンサスレポート；1992)。ヘパリン、強力な抗凝固性を有するクリコサミノグリカン (以下GAG) は、分子重約5,000ないし約30,000ダルトンを有し、D-グルコサミンおよびシューズロン酸またはD-グルクロン酸残基のいずれかの繰り返し単位からなる可変的に硫酸化多糖類の不均一な混合物である。それゆえに、外科的介入の前に、患者は抗凝固予防法、通常ヘパリンを、典型的には術後も7ないし10日間続けて受けるという慎重な処置が講じられる。

他の生命に危険な合併症が、外科的介入後に、血管出血修復の

ために起こる。血管損傷の一つの重篤な形、アテローム性動脈硬化症は、心臓発作、発作および四肢の壊疽を含む疾病の多くの数の中で、北米における全死亡率のおよそ50%の原因を占めている。通常、数々の形の内皮および動脈壁傷害に対する過剰の炎症性繊維増殖性反応は動脈硬化増悪の原因となる。しばしば、動脈硬化と闘うための選択的治療は外科的介入であり、北米で年間150万件以上行われるバイパス移植、動脈内膜切除、および経皮経管介入動脈形成 (以下PCTA) の各処置である。残念ながら、多くの例において、処置の即時的効果は手術患者の利益にはなるが、後になって動脈硬化過程の処置後増強が起こり、外科的介入による長期効果を大きく減少させている。特に腔内腔におけるVSMC増殖は、しばしば、血管の内腔の狭窄および閉塞をもたらす。例えば、PCTA後の再狭窄率は処置後、最初の3ないし6ヶ月において、40%の高さにもなる。年間実施される200,000件以上のバイパス移植例において、40ないし60%がVSMC増殖が関与する増殖性および閉塞性変化により5年以内に働かなくなる。その上、VSMC増殖は5年以内に心臓移植の失敗の50%以上を数える。従って、心臓血管処置後に生じる動脈硬化過程の増強を減少する精成を方法が必要とされる。

VSMC増殖を引き起こす増殖促進活性を阻害する薬剤またはその他の治療は、アテローム性硬化過程の進行を遅くすると考えられる。トロンピンは強力なVSMC増殖促進活性を発現し、そして、ある種の条件下では、血管壁内に存在していることが知られているので、トロンピン阻害剤はアテローム性硬化過程を遅くする。

る、主な候補である。トロンピンの効果を妨害する組成物の中には、*in vitro*および*in vivo*でトロンピンを阻害する市販のヘパリンがある(Castellot,J.J.,J.Cell Biol.102: 1979-84(1986))。ヘパリンは、また、その他の公知のGAGよりも*in vitro*でトロンピンを強力に抗増殖阻害すると考えられている(Castellot,J.J.et al.,J.Cell Biol.90: 3722(1981))。しかし、臨床の間では後者の可能性を支持する証拠は少ない。

更に、ヘパリンは、その強力な抗凝固活性により第一に多くの制限を有している。例えば、成功項に心肺のバイパス（以下CPB）手術を行うために必要とされ、そしてCPBポンプ間通性を維持するために必要なヘパリンの高投与量（>3抗トロンピン単位/㎡血漿を生成する>200単位/kg(以下U/kg)）は患者の罹患率に与える局所的あるいはおびただしい出血をもたらし、過剰の術後血液喪失とそれに従って必要とされる輸血は、CPB手術を受けた患者に与える副作用としてよく文書化されている(Woodman,R.D.,Harker,L.A.,心肺バイパスに伴う出血合併症, Blood 76(9): 1680(1990); Dietrich,W et al.,心肺バイパス中のヘパリン反応についての術前抗凝固の影響, J.Thorac.Cardiovasc.Surg.102: 505(1991))。生命に危険な出血は5ないし25%の症例で報告されており、外科医は手術の出血によるCPB患者の約3%で再開をせねばならないと推定されている。出血合併症は手術出血によるばかりでなく、種々の血漿タンパク質からヘパリンに置き換えることによる全身の抗凝固の延長、および血小板機能におけるヘパリンの阻害効果によってもおこる。プロタミンの形でヘパリン拮抗剤

を正価な量を投与することによりヘパリンの抗凝固効果を逆し、抜カニューレ時における過剰の血液喪失を防止する。しかしながら、プロタミン投与はきわどく

投与量感受性があり、ちょっとした過剰のプロタミン投与でも非常に多くの危険なそして強い生命に関わる、血小板阻害、活性化部分トロンボプラスチン時間（以下APT）の延長、を含む副作用、および全身の低血圧と心臓高血圧の延長の原因となる。(Ireland,H.,Rylance,P.B.,Kesteven,P.,体外循環中の抗凝固剤としてのヘパリン, Heparin,David A.Lane and Ulf Lindahl (編): 549-74(1989))。輸液の1985年度調査によると、CPB処置における最も多くの輸液事故で、症例の2/3で完全に見られる、として「プロタミン反応」をあげている。(Kurz,術後生理および体外循環技術第6回年会, (6th Annual Meeting of Pathophysiology and Extracorporeal Technology), サンディエゴ, カリフォルニア(1986))。それゆえに、CPBは酸補化化合物の常与、あるいは方法が抗血栓活性あるいは出血合併症の悪化または改善を評価する優れた*in vivo*モデルを提供するものである。

ヘパリンは、また、補体系異常の治療に使用されてきた。補体系は、罹病した生体の破壊および炎症の仲介の両者を通して宿主の防御における主要な役割を演じている。補体の異常は、正常なヒト血漿中でグロブリンの約10%を構成している19以上の正常によく作用しているタンパク質のいずれかの欠乏あるいは機能障害により特徴づけられる普通でない状態である。補体欠乏あるいは補体機能障害の患者は、また、過剰の炎症反応の結果として

組織傷害に感受性がある。更に、一時的な血管閉塞からの回復の過程で、あるいは心臓外科手術中の心肺バイパスに応じた補体活性化により初期血管に起因する以上の組織損傷を引き起こす。ヘパリンは、*in vivo*補体阻害性を予測するモデルにおいて、C1、C1阻害剤、C4結合タンパク質、C3b、H因子およびSタンパク質を制御することにより、補体の代替的、古典的および末端経路の活性を阻害することが示されている。(Edens,R.E.,Linhardt,R.J.,Bell,C.S.,Wetler,J.M.,ヘパリンおよび顆粒体ヘパリンは血漿中補体のザイモサンおよびコブラ毒素因子活性化を阻害する, Immunopharmacol.27: 145153(1994))。しかし、ヘパリンの抗凝固活性は、出血、電解質変動および血小板減少症のリスクの増加に寄与している。

CPR 手術中のヘパリンの全身投与による血栓形成および出血に対抗する努力において、ヘパリンの部位特異的投与方法が血液相互作用生体材料である被覆抗血栓性化合物に関連して開発されてきた。抗血栓化合物は生体材料ポリマー表面にイオン付または非有的に結合する。現在得られるヘパリン製剤で被覆されたポリマーの主な欠点はヘパリンの制限された効果である。それゆえに、天然高分子や合成プラスチックのような種々の材料に、充分に、一貫して適用されるように抗血栓活性が最適化された新しい被覆組成物を開発することが重要である。そのような新しい組成物は、理想的に云えば、医用物品の血液相互作用表面を完全に被覆する結果となるであろう。

ヘパリンは天然物であり、種々の異なる生体材料から得られ

る多くの産物の場合について、ヘパリンはその構造、特に硫酸化の程度において、変化する。選択的 O-硫酸化はある種のヘパリンおよびヘパリン様 GAGs の活性を増強する。例えば、O-硫酸化の程度が低いクジラのヘパリンは、ジメチルホルムアミド中トリブチルアンモニウム塩として、選択的に 6-O-硫酸化することで、(Uchiyama, H., Metcalf, A., Ogata, A., Nagasawa, K., J. Biochem. 107: 377 (1990); Ogata, A., Metcalf, A., Uchiyama, H., Nagasawa, K., Carbohydr. Res. 193: 165-172 (1989))、その抗凝活性を増加させる。低レベルの N-および O-硫酸化した別の GAG であるヘパリン硫酸のピリジウム塩は硫酸化されて (Ofosu, F. A., Med. 41, G. J., Blachman, M. A., Buchanan, M. R., Johnson, E. A., Biochem. J. 248: 889 (1987)) 生物活性を増加させる。別に、水あるいはホルムアミド可溶性の GAGs (Kiss, J., Helv. Chimica. Acta, 50: 1423 (1967); Griffin, C. C., Stevenson, J. R., Foley, K. M. XIVth Int. Carbohydr. Sym., Stockholm (1988)) もまたピリジンまたはトリアルキルアミン三酸化硫酸塩固体処理により硫酸化された、そして後者はその安定性の故により好ましい。(Levy, L., Petacek, F. J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 901 (1962))。硫酸化の程度が増加するに従って、血漿中 HCl による トロンビンの阻害についてのデルマトン硫酸 (以下 DS) の触媒効果が改善される。(Ofosu, S. A., Modi, G. J., Smith, L. M., Cerskus, A. L., Hirsch, J., Brachman, M. A. Blood 64: 742-47 (1984))。別の研究では、幾分過剰に硫酸化されたデルマトン硫酸の誘導体につい

て抗血栓薬としての方面が示されている。(Maroufi, R. H., Tapon Bretaudiere, J., Hardiguan, J.,

Sternberg, C., Dautzenberg, M. D., Fischer, A. M. デルマトン硫酸誘導体の抗凝活性について過剰硫酸化法と硫酸化の程度の影響, Thromb. Res. 59: 749-758 (1990))。しかしながら、これらの過剰硫酸化 GAGs は、臨床設定においてヘパリンに対する上記した困難性を克服したことを示していない。

最近の研究で、トロンビン阻害剤としてヘパリンの代替として他の合理的成果が提供されている。例えば、トロンビンは *in vitro* でフィブリンに結合する。この結合は、トロンビン阻害を触媒するヘパリンの能力を著しく減じている (log g. D. J., Jackson, C. M., フィブリンモノマーはヘパリン抗トロンビン III による不活性化からトロンビンを防衛する: ヘパリン療法への意味, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3619-328 (1989))。なぜなら、トロンビン阻害を触媒するためには、ヘパリンは ATIII の基質結合部位、およびトロンビン陰イオン性外側部位--トロンビンがフィブリンに結合するのと同じ部位--の両方に結合しなければならないからである。それゆえ、トロンビンはフィブリンに結合してヘパリン/ATIII に対する外側部位の接近を阻害し、トロンビン阻害剤としてのヘパリンの効果を大きく減じることになる。

ヘパリンの使用により、複雑な血管外科手術が可能となった。しかしながら、以上の考察から云えるように、ヘパリンは、特に全身投与された場合に、血栓の阻害、VSMC 増殖を含む動脈硬化の促進の予防、あるいは血管処理や臓器移植に伴う補体活性化の阻害に対する理想的な候補薬ではない。

ヘパリンの将来有望な代替候補の一つは、デルマトン硫酸、即

ちヘパリン様 GAG (β -ヘパリンまたはコンドロイチン硫酸 B として知られる) である。デルマトン硫酸は、交代で 1, 3 および 1, 4 結合により連結したクロン酸 \rightarrow N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖鎖の繰返しからなる多糖鎖である。その起源および調製方法により、50, 000 ダルトンより高い分子量を有することができる。最初、グルクロノシル \rightarrow ガラクトシル \rightarrow ガラクトシル \rightarrow

キシロシル結合領域を経てコアアミノ酸質に連結したウロ/シルー>N-アセチル-D-グルクサトサミン二糖単位は繰返しならなるポリマーとして発見されている。デルマタン硫酸の単体複製は糖質であるので、エビマー化に敏感である。特に、デルマタン硫酸の生合成において、D-グルクロン酸残基に変化され、D-グルクロンサン残基のいくつかはC-5位でエビマー化され、L-エイズロン酸残基に変化され、次いで、最初にはC-4位でまたC-6位でN-アセチル-D-グルクサトサミンのO-硫酸化がおこる。デルマタン硫酸は、典型的には、イオウおよび窒素含量がそれぞれ約6.2と6.9%の間、および約2.4と2.9%の間であり(Seikagaku America, Inc. 3(1989))、これは構造的にデルマタン-硫酸化二糖類を反映している、ここではこれをデルマタン硫酸 (DS) と称する。軟骨中のデルマタン硫酸およびコンドロイチン硫酸成分は、陽イオン結合能の役割を担っており、陽イオン結合反応はイオン交換型であり、それぞれ別々の異なる陽イオンが軟骨に対する変った程度の親和性を示している。(Dunstone, J. R., 酸性ムコ多糖類と種々の陽イオン間のイオン交換反応, Biochem. J. 85: 336-351 (1962))。

動物モデルにおいて、DSは出血のリスクが低い強力な抗血栓薬であることが示された。(Fernandez, F., Van Rijn, J., Ofosu, F. A., Buchanan, M. R., デルマタン硫酸の出血および抗血栓効果, Brit. J. Haematol. 64: 3(1986))。DSの500 μ g/kg投与量は、ヘパリンの70 μ g/kg投与と同じ血栓形成阻害を示す。より高投与量においては、ウサギの耳での器血的側面からの出血量はDSによる処置よりもヘパリンによる方が大きかった。このことはDSはヘパリンよりも抗凝固剤としてより効果的であり、より安全であることを示しており、DSは、多量の出血を引き起こすことなく血栓形成を阻害するという臨床的に有用であることを示唆している。加えるに、DSは、血小板に対して少しのin vitro効果を有しており、出血の増加なしにウサギにおいてDSの抗血栓効果を40倍までも高く注射できる。(Fernandez, F., Van Rijn, J., Ofosu, F. A., Hirsch, J., Buchanan, M. R., デルマタン硫酸の出血および抗血栓効果, Br. J. Haematol. 64: 309-1(1986))。更に、DSは、フィブリン結合性または遊離であると問わずin vitroでトロンビンの阻害を

効果的に触媒すること、(Okwusidi, J. I., Anvari, M., Kulczycky, M., Blajchman, M. A., Buchanan, M. R., Ofosu, F. A. 抗トロンピンIIIまたはヘパリン補因子IIによるトロンピン阻害のin vivo触媒、および抗血栓効果：未分画ヘパリンおよびデルマタン硫酸の特異的効果, Thromb. Haemorrh. Disorders 1: 77-80(1990))、およびin vivoでヘパリンよりより効果的に前以て生成させたウサギトロンピンに対してトロンピンとフィブリンの両者

の融合を阻害すること、が示された。DS (30 U/kg) は、ヘパリン (150 U/kg) が無効であるウサギモデルでの一次および二次血栓前駆物質の過形成を阻害することが示された。(Buchanan, M. R., Brister, S. J., 急性トロンピン阻害と損傷血管壁再狭窄の阻害、ヘパリンおよびデルマタン硫酸の相対的效果, Bk. of Am. Joint Conf. Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biol., Salt Lake City, UT, p. 18 (Feb. 18-20, 1987))。

DSは、トロンピンを阻害するが止血に関与する他のプロテアーゼは阻害しない、血漿プロテアーゼ阻害剤、HCIIを特異的に阻害する。(Tollefsen, DW., Majerus, D. W., Blank, M. M., ヘパリン補因子II。ヒト血漿におけるトロンピンのヘパリン依存性阻害剤の精製および性状, J. Biol. Chem. 257: 2162-9(1982))。HCIIは阻害剤に結合するに必要な八糖類配列を含む長さの12あるいはそれ以上の残基のDS分画により、活性化される。HCIIに高親和性のDS中の六糖類成分が同定された(Tollefsen, D. W., In: Lane, D. A., Bjork, I., Lindahl, U. (編)、ヘパリンおよび関連多糖類, Plenum Press, New York, pp. 167-7(1992))。

DSは、トロンピンのHCII依存性阻害の促進化によりATIII非依存性経路を通じて、トロンピンを阻害する。(Ofosu, F. A., Modi, G. J., Blachman, M. A., Buchanan, M. R., Johnson, E. A., Biochem. J. 248: 889 (1987))。DSは、主要一硫酸化二糖類配列(IdoA-GalNAc4S)の他に過硫酸化配列(IdoA2S-GalNAc4S)および(IdoA-GalNAc4SS)を幾分か含んでいる。天然生成DS中の過硫酸化配列の濃度はHCII仲介トロンピン阻害に相関する。

(Mascellani, G., Liverani, L., Prete, A., Cupola, P. A., Bergonzini, C., Bianchini

、P.、異なった起源のデルマタン硫酸によるHCII介介トロンビン阻害における、異なった二硫酸化二糖類クラスターの相対的影響、Thromb. Res. 74: 605-1517 (1994)。DS中のL-イズロン酸含量はトロンビン阻害の増加に相関することが示された(Whitma H. C., Choi H. U., Rosenberg, L. C., Church, F. C., ヘパリン補因子IIとピグリカンおよびデコリンの相互作用, J. Biol. Chem. 268: 3920-3924 (1993))。DSは、活性を比較して示されたように、ヘパリンよりも、より低い特異的抗凝阻活性を有している。ヘパリン150 U/mgに比べて、DSは、APTTによる測定で、5 U/mgよりも少ない活性を有する。(Thomas, D. P., Merton, R. E., Barrowcliff, T. W., 抗血栓薬としてのヘパリンおよび関連GAGsの相対効果, Ann. NY Acad. Sci. 556: 313-22 (1989))。DSは、選択的整形外科手術を受ける患者におけるDVT予防、血液透析を受ける患者における血栓形成の予防、および実験的大人のブタにおける心臓バイパスを成功裏に行うのに、効果的な抗凝固剤であることが示された。(Van Rijn, J., McKenna, J., デルマタン硫酸: 抗血栓療法における新しい概念, Diss. Abst. Int. B53: 5662 (1993)) ; (Ryan, K. E., Lane, D. A., Flynn, A., Ireland, H., Boiscclair, M., Sheppard, J., Curtis, J. R., 慢性腎不全に対する血液透析におけるデルマタン硫酸 (MF701) の性状, Thromb. Haemostas 68: 563 (1992); (Briston, S. J., Ofosu, F. A., Reigenhauser, C. L. F., Ganesco, F., Buchanan, M. R., ヘパリンは心臓バイパスに対する理想的な抗凝固剤であるか? デルマタン硫酸は多代抗凝固剤になり得る, Thromb. Haemostas 71: 468-73 (1994))。

しかしながら、残念なことに、有効なDSは実験室においてのものであり、高粘度および貧弱な溶解性と共に低特異的活性であるが故に、実験の臨床的問題を生じる。それゆえ、DSの投与は厄介であり非実用的である。

二糖類当り典型的には一硫酸基を有するDSの生物活性は、別の一つの硫酸基の付加により著しく増加することが発見された。また、更に、得られた組成物、原則的に二硫酸化二糖類残基の繰返しからなるデルマタン二硫酸 (以下DDS) は、*in vivo*で効果的なトロンビン阻害剤であるばかりでなく、補体活性をも、また、効果的に阻害する; そして血管壁過形成を減弱する。このことは、一次的にL-

イズロン酸→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン単位 (IdoA-GalNAc4S6S) からなるDDSについて特別に真実である。更に、DDSは、CPB中でのヘパリンよりもより効果的にトロンビン生成を阻害する、ことが見出された。

よく知られているように、DSは原則として一硫酸化モノマーからなっている、しかし、天然に生じるDS中のいくつかのモノマーは過剰に硫酸化されている。L-イズロン酸が高含量のこれらのDSポリマーは、トロンビン阻害の増加と相関している。(Whitma H. C., Choi H. U., Rosenberg, L. C., Church, F. C., ヘパリン補因子IIのピグリカンおよびデコリンとの相互関係, J. Biol. Chem. 268: 3923-3924 (1993))。その上、DSの硫酸化の程度が上昇すると血漿中のHCIIによるトロンビンの阻害触媒効果が改善

される、ということが更に示唆された。(Ofosu, F. A., Modi, G. J., Smith, L. M., Cerkus, A. L., Hirsch, J., Blajchman, M. A., Blood 64: 742-47 (1984))。やや過剰に硫酸化されたDSの誘導体についての他の研究では、それらの抗血栓薬としての力を示唆している。(Kaaroufi, R. M., Tapon Brezardiere, J., Mardigian, J., Sternberg, C., Dautzenberg, M. D., Fischer, A. M., デルマタン硫酸誘導体の抗凝固性に關する過剰硫酸化法および硫酸化の程度の影響, Thromb. Res. 59: 749-758 (1990))

二硫酸化二糖類残基の含量と2, 4-O-二硫酸化二糖類 (IdoA2S-GalNAc4S)の20%以上を含むデルマタン硫酸分画についてHCII拮抗活性には直線的関係が見出されている。しかしながら、2, 4-O-二硫酸化二糖類残基の含量が低いとき、4, 6-O-二硫酸化二糖類残基 (IdoA-GalNAc4S6S) の量が多くなるの程度であっても抗トロンビン活性に寄与できない。(Kasceliani, G., Liverani, L., Prete, A., Bergonzini, G., Bianchini, P., Torri, G., Bisio, A., Guerrini, M., and Casu, B., デルマトンの定置、H-核磁気共鳴スペクトル法によるヘパリン補因子IIに対する硫酸活性中心の定置, Anal. Biochem. 223: 135-141 (1994))。その他の研究で、トロンビン生成の高いHCII拮抗活性は約3%の4, 6-O-二硫酸化二糖類配列を含むデルマタン硫酸分画に基本的によるとされている。(Lin

hardt, R. J., Desai, U. R., Liu, J., Pervin, A., Hopponsteadt, D., Farced, J., 抗トロピンペリンとしての低分子鼠デルマタン二硫酸、Biochem. Pharmacol. 47: 1241-1252 (1994)。より最近において、N-アセチル-D-ガラクトサミン

残基の4-O-硫酸化はDSの抗凝固活性に必須であり、HClに結合する構造は4-O-硫酸化-L-イゾロン酸->4-O-硫酸化-D-ガラクトサミン配列の繰返しであることが示唆された。(Pavau, M. S. G., Mourao, P. A. S., Mulloy, B., Thiesen, D. M., J. Biol. Chem. 270: 31027-36 (1995))。

ウシ精髄およびブタ皮膚は2, 4-O-二硫酸化二糖鎖残基を含有する市販のデルマタン二硫酸製剤の一次原料である。(Mascellani, G., Liverani, L., Prete, A., Bergozini, G., Bianchini, P., Torri, C., Bisio, A., Guerrini, M. and Casu, B., デルマタンの定量, H-核磁気共鳴スペクトル法によるヘパリン類似因子に対する凝集活性中心の定量, Ann. Biochem. 223: 135-141 (1994))。ブタ精髄由来デルマタン二硫酸は一般的に、同様に4, 6-O-二硫酸化二糖鎖残基を有している。(Mascellani, G., Liverani, L., Prete, A., Bergozini, G., Bianchini, P., Torri, C., Bisio, A., Guerrini, M. and Casu, B., Ann. Biochem. 223: 135-141 (1994); Linhardt, R. J., Desai, U. R., Liu, J., Pervin, A., Hopponsteadt, D., Farced, J., 抗トロピンペリンとしての低分子鼠デルマタン二硫酸、Biochem. Pharmacol. 47: 1241-1252 (1994))。コンドロイチン硫酸Eとしても知られているイカ軟骨からのCAGは、原則として、4, 6-O-二硫酸化二糖鎖からなっている。しかしながら、それは、L-イゾロン酸->4, 6-O-二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミン (100-6 aMacSKS) よりもむしろ原則的にD-グルコン酸->4, 6-O-二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミン単位から成り立っている (Kawai, Y., Seno, N., Ann. N. Y. Acad. Sci. 60: 317 (1966))。

硫酸化の程度は、DSおよびその他のヘパリン様GAGsの抗凝固効果に著しく寄与している重要な機能的性状である。DSにおいて、ガラクトサミン単位は一般的にはO-硫酸化されており、O-硫酸基はしばしば4-位に存在し、と驚

は6-位に存在する。L-イゾロン酸の2-および/または3位は時には同様に硫酸化されている。

発明の開示

二糖鎖当り一硫酸基を一般的に有するデルマタン二硫酸 (DS) は、少なくともヘパリンと同様の抗凝固効果があり、ヘパリンよりもより効果的にトロロンピン生成を予防し、そしてヘパリンよりもより効果的に尿管内腺の過形成を減じる、ことが、今や、見出された。本発明者らはこれらの生物活性は、更に付加的に硫酸基を付加することにより著しく改善されることを見出した。L-イゾロン酸->4, 6-O-二硫酸化二糖鎖残基の繰返しから原則的になりたっている得られたデルマタン二硫酸 (DDS) は、有効なトロロンピン阻害剤であるばかりでなく、補体活性化も効果的に阻害することが見出された。

本発明の目的の一つは、二糖鎖当り2硫酸基以上を有するL-イゾロン酸->N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖鎖の繰返しからなるデルマタン二硫酸 (DDS) の有効量を含む組成物を投与することによるトロロンピン生成を阻害する方法である。

本発明の別の目的は、L-イゾロン酸->4, 6-O-二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖鎖単位の繰返しが約7

5%より多く、約5000と約30,000ダルトンの間の分子量からなるデルマタン二硫酸 (DDS) の有効量を含有する組成物である。

本発明の別の目的は二糖鎖当り2より多い硫酸基を有するL-イゾロン酸->N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖鎖単位の繰返しからなるデルマタン二硫酸 (DDS) の有効量を含有する製剤である。

図面の簡単な説明

本発明の詳細は付属の図面に関連して記載され、それにおいて：

図1は本発明のDDS組成物中の典型的な二糖鎖の化学組成の図を示し；

図2はDS組成物のD₂O中500 mHzのH-NMRスペクトルを示し；

図3は本発明のDDS組成物のD₂O中500 mHzのH-NMRスペクトルを示し；

図 4 は補体阻害パーセント対 D S、D D S およびヘパリンの濃度の図示を示し

図 5 は、ヘパリン 4 0 0 U/kg、ヘパリン 2 5 U/kg および D S を投与された C P H 中および後のブタにおける活性化凝固時間 (A C T) の図示を示し；

図 6 は、D S 抗凝固と C P H を受けたブタにおける T W T および A T / A C T 濃度対時間の変化の図示を示し；

図 7 は、ヘパリン 4 0 0 U/kg、ヘパリン 2 5 U/kg および D S

を投与された C P H 中および後のブタにおける抗トロンビン活性対時間の図示を示し；そして

図 8 は、ヘパリンまたは D S を投与されたブタにおける C P H 中の抗トロンビン活性 (抗 I I a) 対時間の図示を示す。

発明を実行するための最良の態様

デルマトゲン硫酸 (D S) は、D S の調製について通常の方法により組織から得られたもの、その他合成によるもの、あるいは市販品から得られたものの製剤を意味する。D S は in vitro において A T T I I I 関連活性を少し有するかあるいは全く有しない、そして A C T I I 関連抗凝固活性を有することにより特徴づけられる。生合成では C - 5 位のいくつかの D - グルクロン酸残基が L - イズロソロン酸残基に変換されエピマー化される。そして、N - アセチル-D - ガラクトサミンが、最初 C - 4 位で、二次的に C - 6 位で O - 硫酸化される。当業者は、生合成でのエピマー化および硫酸化に関連する一連の工程をよく理解している。哺乳類組織、例えば、卵ならばヒト組織を含む哺乳類組織、は D S の起源として使用される。一般的に、ブタまたはウシ起源からの、血管形成組織および皮膚は D S の原料として好ましく、小腸粘膜は好ましい市販の D S 原料を提供している。一般的に、D S 出発原料は、組織を加水分解し、陰イオン交換樹脂によりポリアニオンを集め、次いで硫酸錯で D S を選択的に沈殿させることにより、選択した組織原料から調製される。

図 1 を参照して、本発明のデルマトゲン二硫酸 (D S) は、天然の D S の化学的酸化により得られた結合した二硫酸化二糖類が

イマーを含むデルマトゲンの重合した鎖の混合物から原則的に成りたっていることが示される。好適には、本発明のポリマーは二糖類当たり 2 より多い硫酸基を有する L - イズロソロン酸 → N - アセチル-D - ガラクトサミン二糖類単位の繰返しを有する。また本発明のポリマーは L - イズロソロン酸 → N - アセチル-D - ガラクトサミン → 4、6 - O - 二硫酸化二糖類単位の繰返しを有することが好ましい。好適には、本発明のポリマーは約 5、5 0 0 から約 3 7、5 0 0 ダルトンの間の範囲、好ましくは重合体鎖中に約 1.6 から約 1.0 0 0 単糖類単位に相当する、約 5、5 0 0 から約 3 0、0 0 0 ダルトンの間の平均分子量を有している。

約 3 0、0 0 0 ダルトン未満の平均分子量を有する D D S は、好ましくは、(1) 天然デルマトゲン硫酸 (D S) の断片の硫酸化によるか、あるいは (2) D D S の脱重合化により多数糖類を開裂することにより、得られる。

デルマトゲン鎖は、(1) コンドロイチナーゼが、N - アセチルガラクトサミンとクロン酸の間の天然デルマトゲン硫酸結合を、非還元末端の 4、5 - 不飽和クロン酸残基を有するオリゴ糖の生成と共に開裂する。(Linhardt, R. J., 分子生物学における手法, A. Varki 編, 2: 17.13.17-17.13.32 (1995)); (2) デルマトゲンのイズロソロン酸カルボキシル基のエステルを、非還元末端に 4、5 - 不飽和クロン酸の生成と共に、(Kiss, J., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 29: 229-303 (1974)、アルカリ性で除去させる (Mardigan, J. S., U. S. Patent 4,440,926 (1984)); (3) デルマトゲンの非硫酸化クロン酸残基を過ヨウ素酸塩で酸化し、次いで得られたジアリデヒドを

水素化ホウ素で還元し、そして塩和な酸性条件下で加水分解することにより開裂する (Wolfrom, M. L., Wang, P. Y., Honda, S., Carbohydr. Res. 11: 179 (1969))、そして非硫酸化クロン酸の残余と共に末端基を生成する、(4) デルマトゲンのグリコシッド結合を、酸化的還元的水解として知られている、過酸化水素を用いたラジカル機構により開裂し (Gilbert, D. L., Gershan, R., Ruhm, K. B., Price, W. E., J. Gen. Physiol., 41: 989 (1958); (Pigman, W., Hawkins, W., Gauding, E., Rizvi, S., Holley, J., Arch. Biochem. Biophys., 80: 184 (1960)); (Pigman, W., Rizvi, S., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1: 39 (1959))、還元末端を有する断片を得る；および (5) デル

マタン類を硫酸およびクロロ硫酸の混合物の作用により硫酸化に付随して開裂する (Nagai, A., Torri, G., U.S. Patent 4,727,063 (1988)), ことを含む、当業者には知られた種々の酵素および化学的方法により、脱重合される。本発明のポリマーはHClの作用を通して紹介される著しいATTT非依存性抗トロンビン活性を有している。

一般的に、DDSは、好ましくは、天然のデルマタン硫酸 (DS) を硫酸化するこ
とにより合成される。極性溶媒、好ましくは、水またはホルムアミドのような極
性溶媒、またはジメチルホルムアミドのような非プロトン性極性溶媒、中に溶解
した市販のDDSを硫酸化試薬、好ましくは、トリ低級アルキルアミン硫酸三酸化
物複合体 (ここで、低級アルキルは、以下において、5ないしそれ以下の炭素原
子のアルキルラジカルを含むものと定義される) のような塩和な硫酸化試薬で、
-20℃から100℃の間の温度で、

約1時間ないし48時間の間、処理される。2-硫酸または3-硫酸のいずれか
または両者を含まないイズロン硫酸基、および4-硫酸または6-硫酸を含まな
いガラクトサミン残基は、それゆえ、硫酸化を受けやすい；しかしながら、受け
やすいガラクトサミン残基はイズロン硫酸基よりはより急速に硫酸化され、選択
性の大きな程度の反応をおこす。この選択性の程度は、調製されるDDSの特に
活性のある抗凝固裂剤をつくらることができる。調製されたDDSは塩を形成する
こともできる。塩形成のための好ましい陽イオンは、バリウム、カルシウム、銅
、リチウム、ナトリウム、カリウム、亜鉛、およびNR₁R₂R₃R₄⁺ (式中R基
は同じかまたは異なった低級アルキル基または水素原子であり得る) からなる群
より選択されたアンモニウムイオン、からなる群より選択される。反応混合物は
電解密度分画により精製されるのが好ましい。DDSは、還元ミノ化によって
血液と相互作用をする仕組みに結合できるような反応基を導入するように酵素体
化することもできる。一つの炭基糖鎖として、DDSはアミン、好ましくは血液
と相互作用をする生体材料に放射線重合するようなアミン、と複合体をつくるこ
とが好ましい。

DDSは静電的手段によって生体材料に「接着」するように行うことができる

。四級アンモニウム塩は吸着表面に結合することができ、そして、それゆえに血
液と接触する生体材料を被覆するのに使用され得る。一級、二級および三級アミ
ンの陽性アミンラジカルおよび四級アンモニウム化合物はDDSの陰性表面ラジ
カルに静電的に結合する。NR₁R₂R₃R₄⁺ (式中R基の1ないし

4の間は同じかまたは異なったアリアル基、アルキル基である) からなる群より
選択された四級アンモニウム塩は、少なくとも1つの基は8より多い炭素原子を
有するアルキル基、または水素原子である。塩化ベンザルコニウムのような四級
アンモニウム塩、アルキル基がC18の範囲であるアルキルメチルペ
ンジルアンモニウムクロリドはこの機能に好ましい。16ないし18炭素原子を
有するアルキルラジカルは、どのような他のラジカルがアミン基に結合するに拘
わらず同様な結合性を有している。アルキル基の炭素数が12に減少すると、界
面活性剤-プラスチック表面固定の程度が著しく減少する。四級アンモニウム塩
との複合体をつくるDDSは、その強力な界面活性性状の故に吸着表面に物理
的に結合し、それ故に血流と接触する人工材料を被覆するのに使用され得る。ア
ミンとDDSの共重合体は、公知の放射線重合技術であるガンマ線照射により、
ポリマーに不可逆的に付着する。

一つの好ましい合成分例においては、反応混合物を約2.5%から25% (重量
/容積) の間、好ましくは約7.5% (w/v) の濃度で市販のDDSを含むホル
ムアミド中に溶解し、トリメチルアミン硫酸トリオキソド複合体と4時間以上、
好ましくは6時間以上インキュベートする。反応は、約10℃と30℃の間、好
ましくは室温でよく進行するが、反応の選択性を増すためには低温が好ましい。
好ましい温度範囲は約-10℃と60℃の間の範囲である。得られた組成物は、
分子量約5000から35000ダルトンの間の範囲で、約16ないし100単
糖単位間の平均

鎖長を有し、二糖당당り2より多くの硫酸基を有する残基を少なくとも75%有
し、平均分子量に依存して、約25ないし125U/mgのin vitro BII抑制
抗トロンビン活性を有する、修飾二硫酸化 (および三硫酸化) 二糖類を含有する

。典型的な製品では、合成に使用される（通常約 $10\text{ U}/\text{mg}$ ）の市販D5製品のHCl1中対トロロンピン活性が2倍より多く、好ましくは、分子量に依存して約25から $125\text{ U}/\text{mg}$ の間に8倍より多く、増加する。本製品によるトロロンピン生成阻害および補体活性化は重量ベースで元の天然D5のそれよりも大きい。

そのようにして合成された組成物、D5、は血液に対する一般的な抗凝固剤として有用であり、従ってin vitroでの血液の採取や分析において、血液と接触する生体材料の被覆、あるいはトロロンピン生成の阻害および/または補体活性化の阻害が望ましいような治療上において使用され得る。D5は好ましくは約25ないし $125\text{ U}/\text{mg}$ の間、より好ましくは $75\text{ U}/\text{mg}$ より大きい範囲で抗f1a活性を有する。

本発明の抗血栓性D5組成物は、トロロンピンの過剰生成および補体活性化により特徴づけられる状態または疾病の処置に対する治療的応用として有用である。これらの状態は、ヒトが、例えば外科手術患者の場合におけるような、外傷に暴露されたときにしばしば生じる。傷または手術に起因する外傷は血管損傷および二次的に平滑筋細胞の増殖、その結果血管再閉塞および過形成がおこるばかりでなく、血液凝固活性化も生じる。これらの好ましくない結果は、血管移植手術、心臓の経心筋の外傷性傷害、脳型動

脈の術後修復、動脈カテーテルの長期留置、侵襲的動脈診断手法、腎、肺または肝の移植、およびバイパス手術手法の後に起こる。上記した状態を治療するためD5の効果はブタおよび/またはウサギモデルを使って試験することができる。

例えば、過形成に対するD5およびヘパリンの効果は以下のようにして試験された：

ウサギ頸動脈を流体圧力拡張によって損傷させた。半数の動物を、 $30\text{ U}/\text{kg}$ D5または $150\text{ U}/\text{kg}$ ヘパリンで2時間にわたって傷害前、後治療した。4週間後、動物を殺処分し、傷害血管壁の過形成の程度をコンピュータを用いた画像解析を用いて組織学的に測定した。別の半数の動物は、第1回の損傷時に無治療とし、回復するに任せた。2週間後、これらの動物を麻酔し、両損傷頸動脈（今

や過形成で閉塞している）を分離した。頸動脈内腔切除術をそれぞれ閉塞血管に行い血流を復活させた。2回目の損傷時に、各動物を上記したようにしてD5あるいはヘパリンで治療し、更に4週間回復させた。これらの動物を殺処分し、血管壁過形成を測定した。D5は両損傷モデルで血管壁過形成を和らげた。ヘパリンは効果がなかった。

これら疾病および状態の全てについて、本発明の組成物の適度の投与は有効である。投与の好ましい様式は非経口投与、外腔投与、血管壁への管腔内投与、および組成物の体内埋め込みによるin vivo投与を含む。ex vivoにも使用可能である。投与は典型的な経路で行われ、一般的には、例えば注射による全身投与を含む。特に好ましいのは静脈投与である、というのは長期間に亘る

通脈投与が容易に継続せきからである。また好ましいのは、浸透圧ポンプを用いた外腔投与による管腔内投与を経る血管系への導入である。典型的な埋め込みは、コラーゲン、ポリアセテート、ポリアセテート/ポリグリコシッド混合物、その他、のような生分解性材料で、好ましくはパッチまたはヒーズとして製剤化されたものを含む。

典型的な投与量は約 $0.1\text{--}5\text{ mg}/\text{kg}/\text{時間}$ で、約5から30日間、好ましくは約7から14日間、の期間に亘る一定の範囲である。特に好ましい投与量は、約 $0.3\text{ mg}/\text{kg}/\text{時間}$ 、あるいは、 70 kg の大人の場合においては、別に、より通常の投与法と同様に使用され得る。低投与量の皮下あるいは筋肉内注射、あるいは静脈注射よりもやや高い投与量での経口投与、または局所損傷に対する経脈あるいは経皮またはその他の局所投与もまた効果的である。例えば支持マトリックス、多分血管移植材料も含めて、のような連続放出装置を通しての局所投与は、外傷の局在に接近し得るところでは特に有用である。更なる投与方法に適した製剤は、公知であり、その他の製剤の適当な懸濁液はRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAの最新版に見出される。

本発明のD5組成は、放射能標識、蛍光標識、色素または酵素を含む通常の方法を使用して生体標識することもできる。D5組成は生体試料中の抗血栓薬に対する競合アッセイにおいて使用することもできる。D5と特異的に免疫反応性

の抗体はよく知られた通常の方法によりつくることができ、そして上記試験に用

い

る情報として有益に使用される。

実施例

本発明は、本発明の好ましい実施態様を示す以下の記述的な実施例を参照する
ことによつて、よりよく理解することができる。実施例は本発明を例示するため
の意味であり、いずれにおいても本発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1

本実施例はデルマタン二硫酸 (DMS) の調製を示す。

一定の操作条件で、平均分子量36,000ダルトン、旋光度-6.2°、ヘバ
リン測定5v/mgおよびHCl/抗Hla活性7U/mg、を有する天然のデルマタン硫
酸 (Celsus Laboratories,Cincinnati,Ohio,lot No.DJ-10494) 67gを、前以
て4Å分子ふるいで乾燥したホルムアミド900mlに溶解した。次いで、トリメ
チルアミン三酸化硫黄100g(32mmol)を、塩化カルシウム乾燥管で窒素か
ら保護された、反応器に加えた。混合物を24時間60℃で反応させた。反応産
物を95%エタノール1litに移し、1%塩化ナトリウム水溶液の5から10lit
rの間を加える前に30分間放置した。pHを中性に調節し、溶液を滅菌し、脱
色し、そして1%塩化ナトリウム水溶液5容量に対して膜濾過し(反応混合物か
ら遊離トリエチルアミンが全て除去されるまで)、次いで精製水の2容量に対し
膜濾過した。産物を濃縮し、凍結乾燥し、DMS58gを得た。表1は反応から分
離したDMSの性状を示す。

表 1

(デルマタン二硫酸の典型的な性状)

平均分子量	28,000
旋光性	-41.3°
ヘバリンアッセイ, u/mg	10
窒素, %	1.80

全イオウ, % 8.24

抗IIa, U/mg 88

抗IIa活性: DMSのHClI伸介抗トロンビン活性を、試料(5.345μg/ml)0
、3mlおよび精製ヒトヘパリン補因子II(Celsus Laboratories,Cincinnati,Ohio
、カタログ#44405により市販)0.1PI即を含む試料溶液80μlを精製と
トロンビン(7.5NIH単位/ml)20μlと、37℃にて180秒間インキ
ュベートすることにより、決定した。次いで色素産生基質(エチルマロニル-p-
o-Arg-pMA、2.5μmol/ml、Celsus Laboratoriesにより、色素産生IIIと
して市販、カタログ#01505)50μlを加え、そしてアミドール性(amido
lytic)トロンビン活性を405nmで測定した。測定はACL300Plus(Instrume
ntation Laboratory, Lexington MA)で行い、USPヘパリン・レファレンス・スタ
ンダードK-3(U.S.Pharmopeial Convention,Inc.,Rockville MD)と比較
して計算した。

平均分子量: 平均分子量は試料を0.5M塩化ナトリウム中に0.8%w/vに
溶解することにより決定した。流出時間(秒)は、

25℃に平衡化した水浴中でオスワルド毛管粘度計により測定し、前記したよう
にして分子量を計算した。

窒素および硫黄: 窒素および硫黄含量は元素分析(Galbraith Laboratories(
Knoxville,TN)(それぞれASTM5291およびD4239)により決定した。

NMR解析: DSおよびDMSの試料を、H-NMRについて約5%(w/v)希釈前にD
2O(重水)で交換した。H-NMRスペクトルは0.24Hzデジタル分解能で、そし
てδ4.64から4.74のプロードシグナルの重なりからHODシグナルを保護
するため60℃にて記録した。DSおよびDMSのスペクトルは図2および3にそれ
ぞれ示す。一般的に両者は類似しているが、二つのスペクトルは、DMSについて
4.6-O-二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンの増加した含量を示
す4.1において相異している。図2は、DSがイソロン酸残基のみを含み、完全
に4-O-硫酸化されているように見える、典型的な天然DSであることを示して
いる。図3はDMSはまた完全に4-O-硫酸化されている(δ4.9)が、しか

の平均となるように力価測定した、モルモットC2(C2gp)をDVB+100μlの各チューブに加えた。最後に、DVB++

100μl中表面C1およびC4 (EAC 1、4 b) を含むヒツジ赤血球1×10⁷を各チューブに加え、チューブを直ちに塩とう水浴中で、30℃、10分間(max)、

インキュベートした。40mMエチレンジアミンを含有するゼラチン・ペロナールバッファ-生理食塩水中に稀釈した0、3mlモルモット凝縮 (DVC) を末端

補体経路成分の源として各チューブに加え、そしてインキュベーションを60分間、37℃で続けた。最終的に、生理食塩水1、5mlを各チューブに加え(水

を加えた100%溶解したチューブは除いて)、チューブを振とうし、遠心し、溶解性を414nmでヘモグロビン放出の測定により評価した。GAGまたはGAG誘導

体を含まないチューブは、非阻害対照とし、セル当り約一溶解現象 (溶解1Z) を有するものとした。試験ブランクおよび100%溶解したチューブはGAGsもC2

も入れなかった。阻害は、試験試料中の細胞中間体 (Z) の溶解を非阻害対照のチューブと比較したものに基いて計算した。

図4を参照して、4種の異なる抗凝固着の比較を示した。DMSは、ヘパリンと本質的に同じ阻害活性を有しているが、DSより著しく大きい活性を有する。

実施例 4

本実施例は、成豚におけるCPH処置での、ヘパリンおよびDSと比較したDMSの使用を示す。

成熟ヨークシャープタ (60-70kg) をケタミンで麻酔し、挿管し、通気呼吸 (一回換気量15mg/kg、12-16回/分) した。換気呼吸の適合性

は、実験中連続的に採取した血液試

料中のpH、pCO₂およびpO₂レベルを測定することにより追従してモニターした。麻酔はEthrane (Anquest, Mississauga, Ontario) および静注Somnoal (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario) で維持した。麻酔は、必要ときは、Pancuronium静注 (Abbott STD Abbott Laboratories, Saint Laurent, Quebec) で維持した。血圧モニター、血液試料の追加採取および溶液および試験化合物の投与のた

し、少量の2-O-硫酸化イズロン酸 (δ5、25) および微量の2、3-ジ-
O-硫酸化イズロン酸 (δ5、48) を含有するほとんど完全に6-O-硫酸化
(δ4、1) されていることを示している。

実施例 2

本実施例は、DMSまたはヘパリンの存在下、トロンビン生成のin vitroでの抗
トロンビンIII-およびNIII伸阻害を示す。

血液を健康ヒトボランティアから採取し、DMSまたはヘパリン

の25抗IIaU/mlをそれぞれ含有する別々のチューブに分配した。時間当たり
のin vitroトロンビン生成は両化合物についてほぼ同じであった。しかし、DMS

の抗IIa誘導の大部分はIIIに関連し、そしてヘパリンの抗IIa活性の大部分はAT
IIIに関連していた。表2参照。

表2

(トロンビンの生成、pMol)		時間 (分)					
		15	30	60	120	240	
ヘパリン、T/HClI	42	53	44	51	48		
ヘパリン、TAT	24	25	26	28	41		
ヘパリン、計	66	78	70	79	89		
DMS、T/HClI	56	42	48	54	61		
DMS、TAT	15	07	09	12	07		
DMS、計	71	49	57	66	68		

実施例 3

本実施例はDMSのin vitro補体阻害活性を示す。

ヘパリン、DSおよびDMSを既述の補体の古典的経路を制御する能力を試験し、
0、1%ゼラチン、0、15Mカルシウム、0、5mMマグネシウムおよび2、
5%デキストロース (DVB++) を含有する半等張ペロナルバップファー生理食
塩水、pH7、5、100μl中に0、15から40μgまでの種々の濃度の調
製し、そして氷中のチューブに入れた。前以てセル当り一溶解現象 (溶解1Z)

めに両側大動脈動脈および動脈に挿入した。

CPB回路は、ポリエチレンチューブおよびカニューレ(Baxter Health Care, Bentley Division, Irvine, CA)、静脈レザバー付き膜式酸素加装置(Cobe CM, Cobe Canada Ltd., Scarborough, Canada) および動脈直列フィルター(Pall Stat Prime Blood Filter, Pall Biomedical Inc., Figuerido, Puerto Rico) から構成された。回路は、リングラクテクトで満たした。血流は、Sarnsローラーポンプ(Model # 5000, Sarns Inc., Ann Arbor, Michigan) を用いて制御し、体温はSarns 3 M Heater Cooler(Model # 48103)を用いて制御、モニターした。

ブタは麻酔され、上記したようにして準備された。胸を正中胸骨切開術で開いた。ブタには同時投与または点滴投与でヘパリンまたはDDSの一回投与量(400 U/kg)を与えた。CPBの開始に伴う血薬動態効果を避けるために、化合物を予測される血薬中濃度に等しい濃度でポンプに加えた。次に、大動脈および心房カニューレを場所に確保し、CPBを開始した。

抗凝固活性、動脈抵抗、循環開塞、および血液消失は以下のようにして評価した。

抗凝固活性：抗凝固活性は、化合物を注射する直前に採取した血液試料およびCPB中およびCPB後120分までに連続して採取した血液試料中の、i) 活性化凝固時間(ACT)の延長、およびii)抗トロンビンおよび抗Xa因子活性(U/ml)で測定した。ACTはHemacron R-400(International Technology Corp., New Jersey)で測定した。抗トロンビンおよび抗Xa因子活性は標準色素産生アッセイを用いて測定した。

血液消失：抜管前後に胸腔中に手術位置で失われた血液の全てを採取し、その容積を測った。CPB後の胸腔につめるのに使用したスポンジの全てを1 lit.の水につけ、赤血球を溶解した。血液固は、分光測光法で水中に存在するヘモグロビン量を測定することにより求めた。全消失血液はこれら二つの測定の合計から計算した。

血栓形成の評価：CPBおよび抜管後に、CPB回路は血液を抜き、全ての部分で可視される血栓およびフィブリン繊維を検査した。

トロンビン/ATIII(TAT)複合体：トロンビンは血栓症における重要な酵素であり、プロトロンビナーゼがプロトロンビンをトロンビンとプロトロンビン断片に開裂するときを生じる。血漿中に一度形成すると、トロンビンは自然に生じる抗プロテイナーゼ、ATIIIにより、トロンビン/ATIII(TAT)複合体を形成して、阻害される。(Teitel, J.M., Bauer, K.A., Lau, H.K., Rosenberg, R.D., F2/F1+2フラグメントおよびトロンビン-抗トロンビン複合体のラジオイムノアッセイを用いたプロトロンビン活性化経路の

研究, Blood 59: 1086-97 (1990))。術前TATレベルは主な手術後にDVTを引き起こすリスクに相関することが示された。測定には、血液を、0.105緩衝化クエン酸を含む凍結チューブ(Becton Dickinson # 6416; Becton Dickinson, Mount ain View, CA)中に、吸引した。血液を、1700×g、15分、22℃で遠心により細胞成分から直ちに分離し、バックアッセイを行うまで-70℃で適量で冷凍した。TATレベルは市販のELISAキットを用いて測定した(Behringwerke, Marburg, Germany)。

トロンビン/ヘパリン補因子II複合体(T/HCII)：ヘパリン補因子II(HCII)は、ヒト血漿中でトロンビンの第二の内因性阻害剤である。トロンビンのDS/HCII依存阻害は、ヘパリン/ATIIIよりも、ウサギにおいて、より効果的に、血栓形成、血栓成長および過形成を抑制する。研究によると、HCIIは、血管外空間を阻害する、あるいは傷害血管壁の表面、生成した血栓または人工表面に結合する、トロンビンの、効果的な阻害剤であることを示している。(VanRyn-McKenna, J., Ofosu, F.A., Garry, E., Hirsh, J., Buchanan, M.R., in vivoにおける血栓成長の阻害に関するデルマトタン細胞およびヘパリンの効果, Ann. NY Acad. Sci., 556: 304 (1989))；(Ofosu, F.A., Fernandez, F., Gauthier, D., Buchanan, M.R., ヘパリンおよびデルマトタン細胞の抗血栓および抗凝固効果の仲介におけるヘパリン補因子IIおよびその他の内因性因子, Semin Throm Haemost; 11: 133 (1985))；(Kwusidi, J.I., Anvari, N., Kulczycky, M., Blajchmann, M.A., Buchanan, M.R., フィブリンは、ヒト血漿中でトロンビン阻害に関しヘパリンの触媒作用を調節す

るが、しかしデルマトラン症候のそれは顕著しない。J. Lab. Clin. Med. 117: 359 (1991)。測定のために血液はTATレベルで処理された。

10単位の特異的 (ATIII+HCII中和) 抗トロンピン活性に基づいて、DMSO、8 mg/kgを一度に(bolus) (lot #DD-00195, Celsus Laboratories, Cincinnati, Ohio) 成豚 (67-70kg) に投与し、次いでCPB中に90分かけてDMS 2.4 mg/kg/時間点滴した、合計すると4.4 mg/kgのDMSを投与した(これは活性150 U/mgのヘパリン2.67 mg/kg投与と比較される)。活性化凝固時間 (ACT) がCPB中270秒に中等度延長されたにもかかわらず、CPBは成功裏に行われた。

このACTは最小抗トロンピンレベルおよび血栓溶解因子レベルに関連していた。より重要なことは、ACTは、点滴を停止したとき、ベースライン測定値内に急速に戻ったことである(図4参照)。CPB中に生じたトロンピンの大部分はHCIIにより阻害された、これは、図6で示すトロンピン/HCII (T/HCII) 複合体の増加レベルにより示される。このことは、ヘパリンで臨床的および実験的にみられること、推定ATUsは700秒より大きく延長される、TATレベルは、少なくとも24時間上昇したまま残る、TATおよびT/HCII両者のレベルは、DMSを続けなくなるのとベースラインまで急速に戻る、といったことと著しく対照的である。このCPB後のTATおよびT/HCIIレベルの下降はDMS/HCIIがヘパリン/ATIIIよりもより効果的にトロンピンを阻害することを示唆している。

比較例：計12頭の動物をCPBの対象とし、CPB開始前に3

処置中1に投与した。

シリーズ1:	DDS 25
n = 4	デルマトラン二硫酸 25 U/kg 一時投与 (2.5 mg/kg)
	(Celsus Laboratories, Cincinnati, Ohio, Lot No. DD-00195)
シリーズ2:	HEP 25
n = 4	ヘパリン 25 U/kg 一時投与 (17 mg/kg)
	(Organon, Canada, Ltd., Toronto, Canada)
シリーズ3:	HEP 400
n = 4	ヘパリン 400 U/kg 一時投与 (27 mg/kg)
	(Organon, Canada, Ltd., Toronto, Canada)
	(これはヒトへのCPBでの標準投与量である。)

CPBは、高投与ヘパリン処理動物およびDMS処理動物で成功した；即ち、CPB中循環中に肉眼的に凝固はみられなかった。CPB後の血液は液性を保った、および動物は都合の悪い作用を被らなかった。このことは低投与ヘパリン処理動物でのCPBと著しく対照的であった、即ちCPB中凝固がみられた、CPBを止めたとき、血流が低下したとき循環中に血液凝固が生じ、それが必要に応じてCPBを再開することが不可能となった。このことは臨床で約30%起こることを示している。更に、凝固血液は患者から失われ、術後出血のリスクおよび術後血液産物を使用する必要性が増加する。血液喪失はHEP 400処理ブタに比較してDD 25およびHEP 25動物で少なかった。表3参照。

表 3

(胸壁出血、ml/2時間)

別に、一般的に製造中に稀が性ソーダで中和してナトリウム塩としてある本発明のDDS組成物を、約1ないし15%の間、好ましくは7%の濃度に、精製水で稀釈し、分子量カットオフ1000ダルトンの膜 (PCAC, Millipore Corp. Bedford MA) を適当な装置 (Pellican Millipore Corp., Bedford MA) で濾過させる。DDSの濃度を約0.5-2.0M塩化カルシウム (pH 7.4に水酸化カルシウムで調節) を連続添加して保つ。過剰の塩化カルシウムは精製水を連続添加して濾過して除き、そしてDDSのカルシウム塩を凍結乾燥により回収した。炎光分折で測定した典型的な転換収率は90%より大であり、カルシウムは9.5%より多く、ナトリウム含量は1000ppm未満である。

同様な方法がアンモニウム、バリウム、銅、リチウム、カリウムおよび重鉛の塩を含む他の塩に施される。

実施例 6

本実施例はデルマタン硫酸(DS)のフラグメントの調製を示す。

デルマタン硫酸の酸化・還元解重合：平均分子量35000ダルトン、イオウおよび窒素含量、それぞれ2.0および6.5%、およびヘパリン測定4u/mg、を有する天然DS (Celcius Laboratories, Cincinnati, Ohio, Lot. No. DI-1039) 4) 50gを精製水で稀釈して10% (w/v) の濃度にした。攪拌下、前以て塩酸で再生しておいたDuo-lite C-20 (Rohm & Haas, Philadelphia, PA) を加えてpHを2.5に低下させた、ここで樹脂をブブナー漏斗を用いて濾過し除去した。攪拌しつつ、DS溶液を75℃に予加熱し、35%過酸化水素10mlを加え、次いで23psi圧力で15分間減圧した。このサイクルを終え、溶液を減圧器から除き、40℃未満に冷却し、が性ソーダでpH6.5-7.0に調節した。エタノール1容量を加えてDSを沈殿させた。沈殿は減圧下乾燥して除去した、脱重酸化DSは以下の性状を有する。

表 4

(DSのフラグメントの典型的な性状)

回収、g	40
平均分子量	5,600

薬剤	動物数	平均 (+SEM)	P-値
HEP 400	6	161 ± 36	
HEP 25	4	114 ± 21	0.594
DDS 25	4	81 ± 13	0.07

DDS処置動物において、ACTはCPB中270秒を超えなかった、そしてDDS処置動物でモニタリング中2時間内で標準に戻った(図5)。このACTは最小凝集血小板リン活性に関連している(図7)。TATレベルおよびPT/HCIIレベルはCPB時間中増加しなかった(図8)。HBP25処置動物において、所見は同様であった。ACTはCPB中260秒を超えなかった(図5)、これもまた最小凝集血小板リン活性に関連している(図7)。HBP400 (標準的なヒトの臨床投与量) 処置動物において、ACTは臨床状態でみられるようにベースラインを超えて著しく上昇した。これが抗血小板リン活性に依って関連している(図7)。TATおよびPT/HCIIレベルはCPB中上昇したが、DDS25またはHBP25処置動物のいずれかよりも少なかった(図8)。

これらのデータは、1) DDSの低全身抗凝結度とCPBが成功しており、CPB後の血小板生成はDDSで改善されたがヘパリンでは改善されなかった、2) DDS/HCIIはヘパリン/ATIIIよりもより効果的に血小板生成を阻害する；2) この効果は低抗凝結度と尿で達成されるので、従って出血のリスクが減少する、

ことを示している。

実施例 5

本実施例はDDSの別の塩はどのようにして生じるかを示す。

当業者によく知られているように、塩の形は血中のある種のイオン化された電解質に対する親和性を決定し、血中ガス成分を決定付ける。実施例1のDDS組成物のナトリウム塩を異なった陽イオンの塩化物と反応させ別の塩の形または別の塩との混合物をつくる。DDSのこのようなイオン交換は、前以てチャージした陽イオン交換樹脂を通して、塩化物の溶液のストリーと混ぜ、次いで溶媒沈殿、または別の塩化物を含有する水溶液に対して濾過することにより達成される。

アッセイ、u/mg	< 2
窒素、%	2.42
全イオウ、%	6.49
実施例 7	

本実施例はデルマトン二硫酸 (DDS) のフラグメントの調製方

法を示す。

DDSはそのウロン酸カルボキシシル基でエステル化され、当業者によく知られた方法によるアルカリ条件化での制御された脱離により開裂される。本工程において、DDSは、Hyamine 1622のような疎水性第四級アモンニウム塩と接触させることにより、有機溶媒可溶型に変換される。溶媒、例えばジメチルホルムアミド中のDDSのHyamine塩溶液に塩化ベンジル（または適当に置換されたベンジル）を加え、3日間室温で放置する。次いで、酢酸ナトリウムのメタノール10%溶液の当量を加え、生じた沈殿を濾過して分離し、メタノールで洗滌し、減圧乾燥してDDSエステルのナトリウム塩を得た。製造産物は、200mm付近のベンジル基のuv吸収により特徴づけられる。ベンジルエステルの、当業者によく知られた条件で、アルカリ脱離に付す。

別に、DDSは0.15M酢酸-0.15M NaCl-0.005M CaCl₂-pH 6.9に溶解する。ポリサッカライドリアーゼを加えた後、混合物を室温で二硫酸の平均分子質量が約5000ダルトンに低下するまで室温でインキュベートする。脱重合は232nmのuv吸収（糖の非還元末端における二重結合の生成による）の増加、および粘度計によるポリマー-混合物の平均分子質量測定によりモニターする。

実施例 8

本実施例はデルマトン硫酸 (DS) およびデルマトン二硫酸 (DDS) の分画の調製を示す。

天然のデルマトン硫酸 (DS) を分画し、次いで硫酸化する。DS

およびその他の構造的に関連したグリコサミアミノグリカン(Linhardt, R.J.; Desai

U.R., Liu, J., Pervin, A., Hoppensteadt, D., Farced, J., 抗血栓症薬としての低分子量デルマトン硫酸、Biochem. Pharmacol. 49: 1241-1252 (1994))に適用される当業者に知られた分画技術は溶媒分画、限外濾過、およびイオン交換、アフィニティおよびゲルクロマトグラフィーを含む。

DSの電荷密度分画：陰イオン交換樹脂 (Lewatit S-6238-A, Bayer, Pittsburg PA) を含む7.5" x 50" カラムを塩酸で再生し、精製水(USP)でリンスし、そして0.5モルNaCl、29lit.で平衡化した。次いで、0.5モルNaCl、19lit.に溶解したDS 400g、lot #D1-10094、を流速200ml/分で給むにチャージした。カラムを更に0.5モルNaCl、12lit.で洗滌した。続いて、Df-104-1、28lit.を200ml/分で集め、精製水(USP)に対して伝導度200S未満になるまで透析濾過し、定量モリッシュ反応試験 (Mische, Z., 一般呈色反応, Mds. Carbohydr. Chem. 1963; 1: 478-81) により炭水化物を同定し、限外濾過で濃縮し、凍結乾燥した。その他のサブフラクションは、Df-104-2からDf-104-4の分画の採取のために1.2、1.6および2.0モル NaClの28lit.増量分でカラムにチャージすることにより、同様の方法で、溶出した。表5参照。

表 5

(電荷密度分画により得た天然デルマトン硫酸の分画)

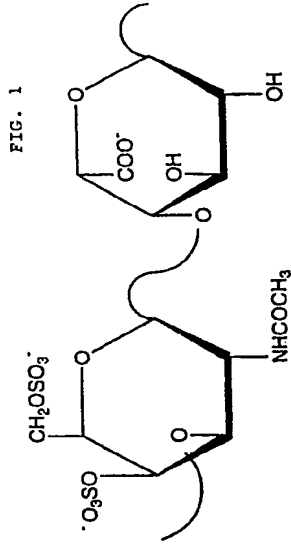
	DS-10494	DF-104-1	DF-104-2	DF-104-3	DF-104-4
回収、g	164	64	118	40	
分子重量	36,000	51,366	26,801	26,653	23,116
旋光度	-62				-31
アッセイ、u/mg	5	<2	<2	10	>15
窒素、%	2.33	2.60	2.57	2.68	2.22
全イオウ、%	7.16	6.27	5.99	6.83	6.61
抗 Ha、U/mg	7	6	2	6	10
抗 Xa、U/mg	9	1	2	12	>15

DDSの電荷密度分画：0D-00185、5gを0.5モルNaCl、750mlに溶解し

され、MBTHアッセイにより定量化される。(Sawicki, E. T. R., Scannely, T. W. and Elbe
rt, W., Anal. Chem. 33: 93-96 (1961)), 調製したDMS誘導体は、95%エタノール
3倍量により沈澱し、傾斜、1M塩化ナト
リウム中に溶解することにより回収される。誘導体は、次いで、95%エタノー
ル3倍量で再沈澱により精製され、傾斜または過過により集められ、次いで95
%エタノールおよびアセトンで脱水され、溶媒で破砕され、傾斜または過過によ
り固体が集められる。集められた誘導体は減圧除去し、白色固体を得る。活性化D
Sは、当業者によく知られた条件を用いて、シッフ塩基形成およびシアノ水素化
ホウ素ナトリウムによる還元によりアミンを有する材料に共有結合で固定化され
る。

本発明はその特定の実施例および実施態様によって主として記載されているが
、上述の記載は当業者にとって多くの選択、変形、および変化を示唆している。
従って、書き添えられた請求項は発明の精神と範囲、それらの選択、変形および
変化内のものとして包含することを意図している。
以下を特許請求する。

【図1】



デルマタン 二硫酸 DDS

、0.5モルNaClで平衡化した4.4×4.3cmカラムに流速100ml/時間
でかけた。カラムを0.5モルNaClの1カラム容積で洗脱した。1.4および1
.6モル溶出液を合わせて001951として集めた。2モルNaCl溶出を001952として
集めた。カラムを止めて、第2の2モル溶出を001953として集めた。2.5モル
NaClの主溶出液は001954として集めた。一夜カラムを止めた後、第2の2.5モ
ルNaCl溶出を001955として集めた。一夜カラムを止めた後、カラムを洗脱した。
3モルNaCl溶出は更なる物の溶出に失敗した。表5に示すデータは電荷密度はDD
Sの塩11a活性を最適化するのに効果的な方法である、ことを示した。

表 5

(電荷密度分離により得られたDMSの分離)

	001951	001952	001953	001954	001955
回収、g	0.08	0.4	0.2	3.8	0.5
平均分子量	14,434	16,613	37,305	30,169	31,654
粘度 IIa, u/mg	<18	30	71	74	64

実施例 9

本実施例はデルマタン二硫酸を基にした血栓抵抗性被覆の調製を示す。
DMS水溶液を、塩化ベンザルコニウム、塩化トリドデシルメチルアンモニウム
、または当業者によく知られた、その他の塩、のような陽水性第四級アンモニウ
ム塩の水溶液の化学量論的過剰量を混合する。得られたDMS第四級アンモニウム
塩は真空過過で集め、水でよく洗淨し、減圧乾燥した。この塩、水または稀生理
食塩水に不溶、はエタノール、イソプロパノールまたはその他の適当な有機溶媒
に可溶であり、血液に接触することになる人工表面を被覆するのに使用される。

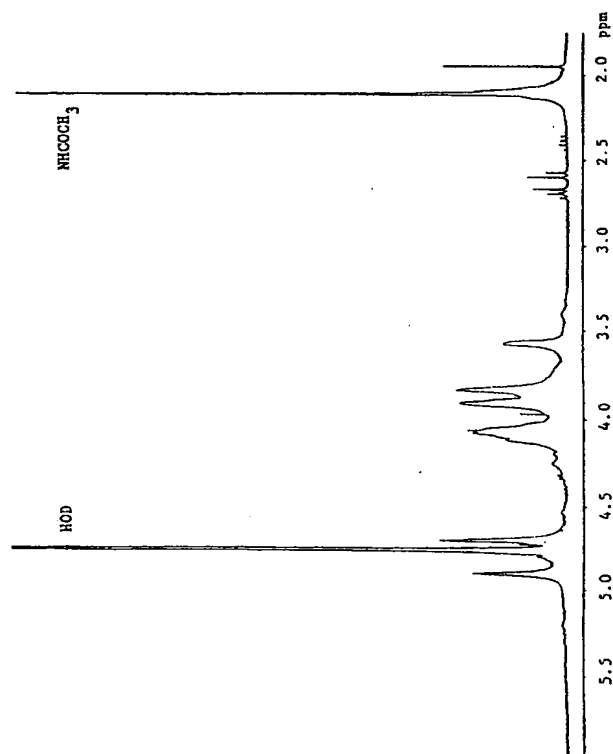
実施例 10

本実施例は、共有結合固定化デルマタン二硫酸を示す。
アミンとDMSのコポリマーは、放射線重合として知られている技術、ガンマ線
照射によりポリマーに不可逆的に付着する。

別に、DMSを、メタヨウ素酸ナトリウム化学量論的制限量とpH3、4℃
で24時間水溶液中で反応させる。この時間中、DMS中の非硫酸エステル化クロ
ン酸残基の小部分が過ヨウ素酸で開裂して、新しく生成したアルデヒド基が露出

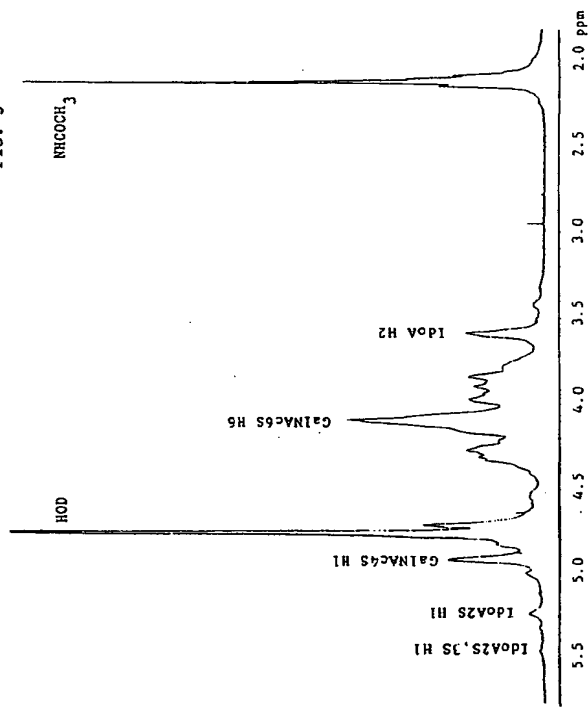
【図2】

FIG. 2

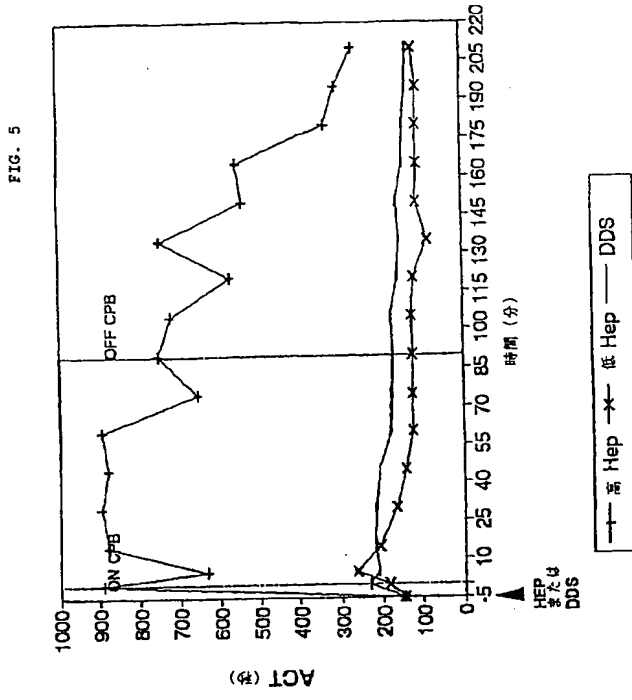


【図3】

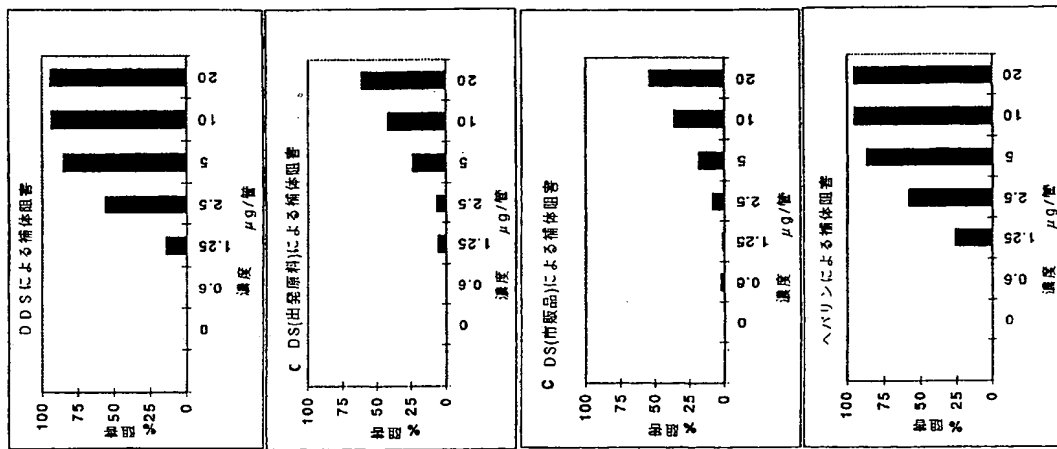
FIG. 3

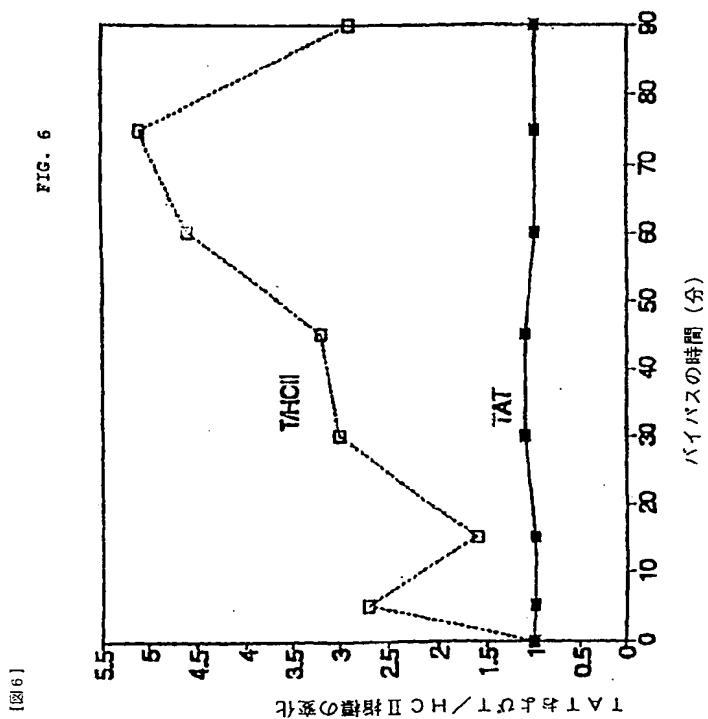
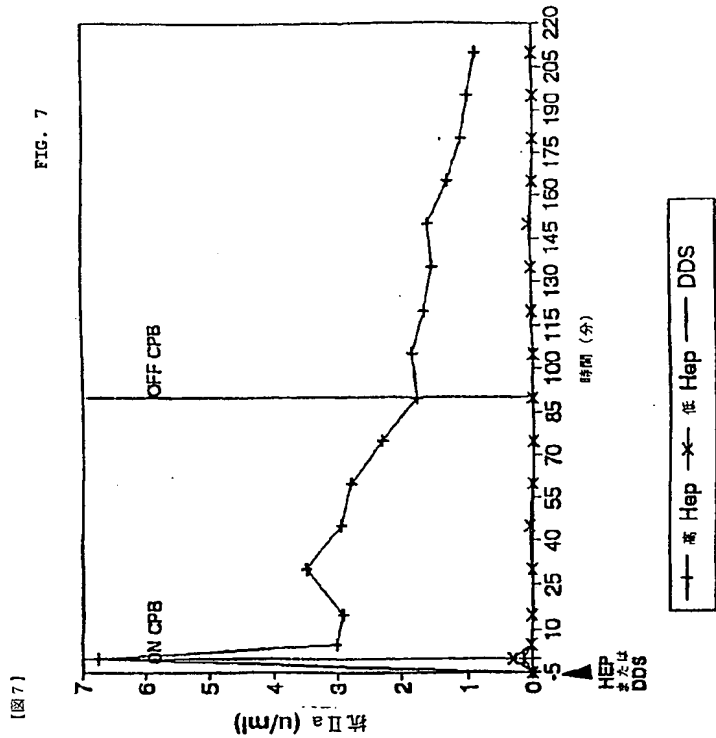


【図5】



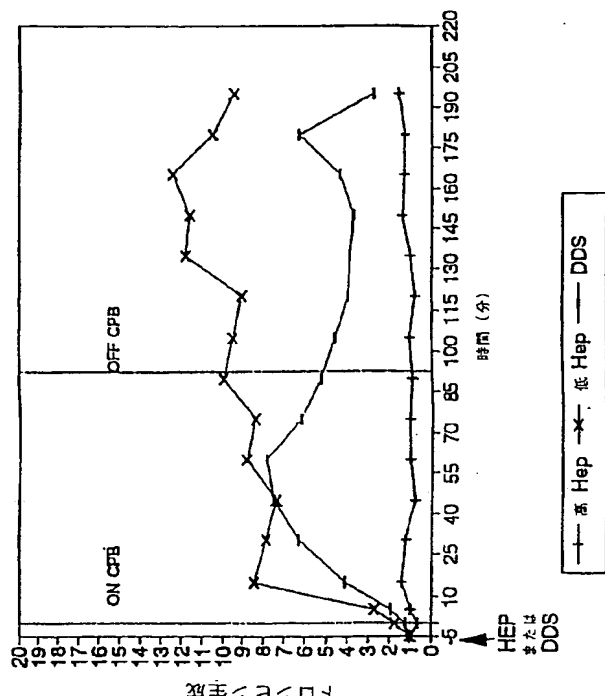
【図4】





【図 8】

FIG. 8



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年3月15日（1999. 3. 15）

【補正内容】

本発明の別の目的は二糖類当り2より多い硫酸基を有するシューズロン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しからなるデルマトン二糖酸（DDS）の有効量を含む製剤である。

図面の簡単な説明

本発明の詳細は付属の図面に関連して記載され、それにおいて：

図1は本発明のDDS組成物中の典型的な二糖類の化学組成の図を示し；

図2はDDS組成物のD₂O中500 mHzのH-NMRスペクトルを示し；

図3は本発明のDDS組成物のD₂O中500 mHzのH-NMRスペクトルを示し；

図4a、4b、4cおよび4dは、それぞれ、補体阻害パーセント対DDS、DS（糖化合物）、DS（市販品）およびヘパリンの濃度の図を示し；

図5は、ヘパリン400 U/kg、ヘパリン25 U/kgおよびDDSを投与されたCPR中および後のブタにおける活性化凝固時間（ACT）の図を示し；

図6は、DDS抗凝固とCPRを受けたブタにおけるTATおよびPI/HCII濃度対時間の図を示し；

図7は、ヘパリン400 U/kg、ヘパリン25 U/kgおよびDDSを投与されたCPR中および後のブタにおける抗トロンビン活性対時間の図を示し；そして

図8は、ヘパリンまたはDDSを投与されたブタにおけるCPR中の抗トロンビン活性（抗IIa）対時間の図を示す。

発明を実施するための最良の態様

デルマトン二糖酸（DS）は、DSの調製について通常の方法により組織から得られたもの、その他合成によるもの、あるいは市販品から得られたものの製剤を意味する。DSはin vitroにおいてATIII関連活性を少し有するあるいは全く有しない、そしてHCII関連抗凝固活性を有することにより特徴づけられる。生合成ではC-5位のいくつものD-グルクロン酸残基がシューズロン酸残基に変換されエ

ビマー化される。そして、N-アセチル-D-ガラクトサミンが、最初C-4位で、二次的にC-6位でO-硫酸化される。当業者

測定はAL300Plus(Instrumentation Laboratory, Lexington MA)で行い、USPヘパリン・レファレンス・スタンダード K-3 (U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville MD)と比較して計算した。

平均分子量：平均分子量は試料を0.5M塩化ナトリウム中に0.8%w/vに溶解することにより決定した。流出時間(秒)は、25℃に平衡化した水浴中でオスワルド毛管粘度計により測定し、前記したようにして分子量を計算した。

窒素および硫黄：窒素および硫黄含量は元素分析 (Galbraith Laboratories(Knoxville,TN) (それぞれASTM 5291およびM4239)により決定した。

MMR解析：DSおよびDSSの試料を、H-NMRについて約5%(w/v)希釈前にD₂O(重水)で交換した。H-NMRスペクトルは0.24Hzデジタル分解能で、そして4.64から4.74のブロードシグナルの重なりからHODシグナルを排除す

るため60℃にて記録した。DSおよびDSSのスペクトルは図2および3にそれぞれ示す。一般的に両者は類似しているが、二つのスペクトルは、DSSについて4,6-O-二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンの増加した含量を示す

4.1において出現している。図2は、DSがイズロン酸基のみを含み、完全に4-O-硫酸化されているように見える、典型的な天然DSであることを示している。図3はDSSはまた完全に4-O-硫酸化されているが、しかし、少量の2-O-硫酸化イズロン酸および2,3-ジ-O-硫酸化イズロン酸を含有するほと

んど完全に6-O-硫酸化

化(δ4.1)されていることを示している。

実施例 2

本実施例は、DSSまたはヘパリンの存在下、トロンビン生成のin vitroでの抗トロンピンIII-およびHCII仲介阻害を示す。

血液を健康ヒトボランティアから採取し、DSSまたはヘパリンの25単位IU/mlをそれぞれ含有する別々のチューブに分配した。時間当たりのin vitro トロ

ビン生成は両化合物についてほぼ同じであった。しかし、DSSの抗IIa活性の大部分はHCIIに関連し、そしてヘパリンの抗IIa活性の大部分はATIIIに関連していた。後者参照。

表 2

(トロンビンの生成と阻害、pMol)							
時間 (分)		15	30	60	120	240	
ヘパリン、T/HCII	42	53	44	51	48		
ヘパリン、TAT	24	25	26	28	41		
ヘパリン、計	66	78	70	79	89		
DDS、T/HCII	56	42	48	54	61		
DDS、TAT	15	07	09	12	07		
DDS、計	71	49	57	66	68		

実施例 3

本実施例はDSSのin vitro補体阻害活性を示す。

ヘパリン、DSおよびDSSを既述の補体の古典的経路を制御す

る能力を試験し、0.1%ゼラチン、0.15Mカルシウム、0.5mMマグネシウムおよび2.5%デキストロース (DVB++)を含有する半等張ペロナールバッファ-生理食塩水、pH7.5、100μl中に0.15から40μgまでの種々の濃度で調製し、そして水中のチューブに入れた。前以てセル当り-溶血現象 (溶解12)の平均となるように力価測定した、モルモットC2(C2gp)をDVB++100μlの各チューブに加えた。最後に、DVB++100μl中表面C1およびC4 (EAC1,4b)を含むヒツジ赤血球1×10⁷を各チューブに加え、チューブを置ちに振とう水浴中で、30℃、10分間 (tmax)、インキュベートした。40mMエチレンジアミンを含有するゼラチン・ペロナールバッファ-生理食塩水中に稀釈した0.3mlモルモット濃縮 (CPC)を末端補体経路成分の源として各チューブに加え、そしてインキュベーションを60分間、37℃で続けた。最終的に、生理食塩水1.5mlを各チューブに加え(水を加えた100%溶解した

チューブを除いて、チューブを破とうし、遠心し、溶解性を414nmでヘモグロビン放出の測定により評価した。GAGまたはGAG誘導体を含まないチューブは、非阻害対照とし、セル当り約一溶解現象（溶解12）を有するものとした。試験ブランクおよび10%溶解したチューブはGAGsもC2も入れなかった。阻害は、試験試料中の細胞中間体（2）の溶解を非阻害対照のチューブと比較したものに基いて計算した。

図4aから4dを参照して、DMS(図4a)、氯化化合物DS(図4b)、市販品DS(図4c)およびヘパリン(図4d)補体阻害活性の比較

を示した。図4aのDMSは、図4dのヘパリンと本質的に同じ阻害活性を有しているが、図4bまたは4cのDSより著しく大きい活性であることが判る。

実施例 4

本実施例は、成床におけるCPH処置での、ヘパリンおよびDSと比較したDMSの使用を示す。

成熟ヨークシャーブタ(60-70kg)をケタミンで麻酔し、挿管し、通気呼吸(一回換気量15ml/kg、12-16回/分)した。換気呼吸の適合性は、実験中連続的に採取した血液試料中のpH、pCO₂およびpO₂レベルを測定することにより連続してモニターした。麻酔はEthrane(Anaquest, Mississauga, Ontario)および静注Somatol (MTC Pharmaceutical, Cambridge, Ontario)で維持した。麻酔は、必要ときは、Pancuronium静注(Abbott, STD, Abbott Laboratories, Saint Laurent, Quebec)で維持した。血圧モニター、血液試料の追加採取および溶液および試験化合物の投与のために両側大腿骨動脈および静脈に挿管した。

CPH回路は、ポリエチレンチューブおよびカニューレ(Baxter Health Care, Bentley Division, Irvine, CA)、静脈レザバ付き膜式酸素加装置(Cobe ODL, Cobe Canada Ltd., Scarborough, Canada)および動脈直列フィルター(Pall Stat Prime Blood Filter, Pall Biomedical Inc., Figueroa, Puerto Rico)から構成された。

【特許請求の範囲】

1. L-イソロン酸→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖単位約75%より多い繰返しを有するデルマタン硫酸を含む組成物。
2. デルマタン硫酸は陽イオン対イオンを有し、該陽イオン対イオンはナトリウムである請求項1記載の組成物。
3. デルマタン硫酸がアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、カリウム、および亜鉛からなる群より選択された陽イオン対イオンを有する請求項1記載の組成物。
4. 天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製された請求項2記載の組成物。
5. 完全化学合成により調製された請求項1記載の組成物。
6. 天然のデルマタン硫酸が天然起源の精製されたものより単離されたものである請求項4記載の組成物。
7. デルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製された請求項1記載の組成物。
8. トロンビン生成の阻害に対して治療を必要とする患者に、L-イソロン酸→4,6-ジ-O-硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖単位約75%より多く有するデルマタン硫酸の医薬としての有効成分を含む組成物を投与することからなるトロンビンの生成を阻害する方法。
9. デルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンとの間である請求項8記載の方法。
10. 該組成物が、約25と約125μgとの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項8記載の方法。
11. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムである請求項8記載の方法。
12. デルマタン硫酸が陽イオン対イオンを有し、それがアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択される請求項8記載の方法。

13. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項8記載の方法。

14. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項8記載の方法。

15. 天然のデルマタン硫酸が天然起源の精製されたものより単離されたものである請求項13記載の方法。

16. 該組成物がデルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項8記載の方法。

17. 投与工程が更に該組成物を *in vivo* で投与することを含む請求項8記載の方法。

18. 投与工程が更に該組成物を非経口的に投与することを含む請求項8記載の方法。

19. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求項8記載の方法。

20. 補体活性化の阻害に対して治療を必要とする患者に、L-イソロン酸- γ -D-グルタミン-N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しを約75%より多く有するデルマタン

硫酸の医薬としての有効量を含む組成物を投与することからなる補体活性化を阻害する方法。

21. デルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と約30,000ダルトンとの間である請求項22記載の方法。

22. 該組成物が、約25と約125 μ gとの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項20記載の方法。

23. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムである請求項22記載の方法。

24. デルマタン硫酸がアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された陽イオン対イオンを有する請求項20記載の方法。

25. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項20記載の方法。

26. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項20記載の方法。

27. 天然のデルマタン硫酸が天然起源の精製されたものより単離されたものである請求項25記載の方法。

28. 該組成物がデルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項20記載の方法。

29. 投与工程が更に該組成物を *in vivo* で投与することを含む請求項20記載の方法。

30. 投与工程が更に該組成物を非経口的に投与することを含む請求項20記載の方法。

31. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求

項20記載の方法。

32. L-イソロン酸- γ -D-グルタミン-N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しを約75%より多く有するデルマタン硫酸の第四級アンモニウム塩を調製し、そして該デルマタン硫酸第四級アンモニウム塩を血液と相互作用する人工材料の表面上に固定化することよりなる血液相互作用人工材料を調製する方法。

33. (削除)

34. デルマタン硫酸の平均分子量が約5,000と30,000ダルトンとの間である請求項32記載の方法。

35. デルマタン硫酸が、約25と約125 μ gとの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項20記載の方法。

36. デルマタン硫酸が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項32記載の方法。

37. デルマタン硫酸が完全化学合成により調製されたものである請求項32記載の方法。

38. 天然のデルマトン硫酸が天然起源の精製されたものより分離されたものである請求項36記載の方法。

39. デルマトン硫酸がデルマトン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項32記載の方法。

40. L-イソロース酸->4,6-ジ- O -硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類の繰返しを約75%より多く有し、而も新しく形成したアルデヒド基を有するデルマトン硫酸を調製し、そして新しく形成したアルデヒド基を有する該デルマトン硫酸

酸を血流と相互作用する人工材料の表面上に共有結合で固定化することよりなる血液相互作用人工材料の調製方法。

41. 新しく形成したアルデヒド基がデルマトン硫酸の過ヨウ素酸化により得られることよりなる請求項40記載の方法。

42. (削除)

43. デルマトン硫酸の平均分子量が約5,000と30,000ダルトンとの間である請求項40記載の方法。

44. 新しく形成したアルデヒド基を有するデルマトン硫酸を調製するために使用されるデルマトン硫酸が、約25と約125 μ gとの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項40記載の方法。

45. 組成物が天然のデルマトン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項40記載の方法。

46. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項40記載の方法。

47. 天然のデルマトン硫酸が天然起源の精製されたものより分離されたものである請求項45記載の方法。

48. 組成物がデルマトン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項40記載の方法。

49. トロンビン阻害を必要とする血液に、L-イソロース酸->4,6-ジ- O -硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しを約75%より

多く有するデルマトン硫酸の医薬としての有効量を含有する組成物を投与することからなるトロンビンの生成を阻害する方法。

50. 血液が血流生成組織である請求項49記載の方法。

51. デルマトン硫酸の平均分子量が約5,000と30,000ダルトンとの間である請求項49記載の方法。

52. 該組成物が、約25と約125 μ gとの間の範囲内の抗IIa活性を有している請求項49記載の方法。

53. デルマトン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムである請求項49記載の方法。

54. デルマトン硫酸がアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された陽イオン対イオンを有することよりなる請求項49記載の方法。

55. 組成物が天然のデルマトン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項49記載の方法。

56. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項49記載の方法。

57. 天然のデルマトン硫酸が天然起源の精製されたものより分離されたものである請求項55記載の方法。

58. 該組成物がデルマトン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項49記載の方法。

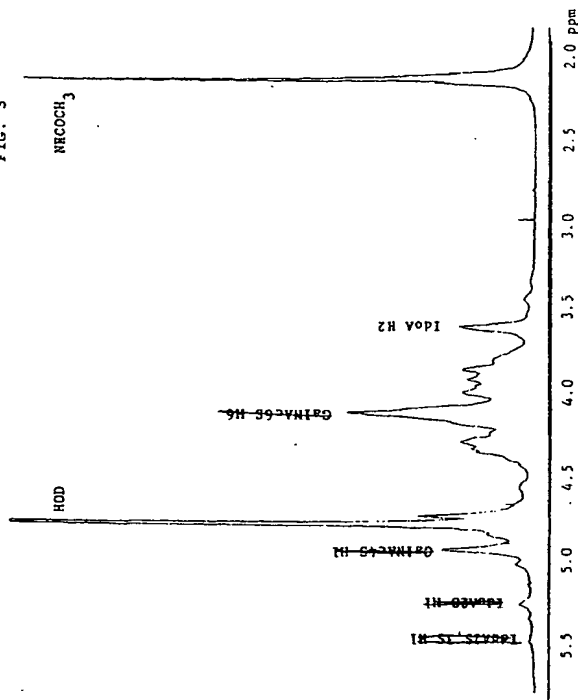
59. 血管内膜過形成の阻害に対して治療を必要とする患者に、L-イソロース酸->4,6-ジ- O -硫酸化 N-アセチル-D-ガラクトサミン二糖類単位の繰返しを約75%より多く有するデルマトン硫酸の医薬としての有効量を含有する組成物を投与することからなる血管内膜過形成を阻害する方法。

60. デルマトン硫酸の平均分子量が約5,000と30,000ダ

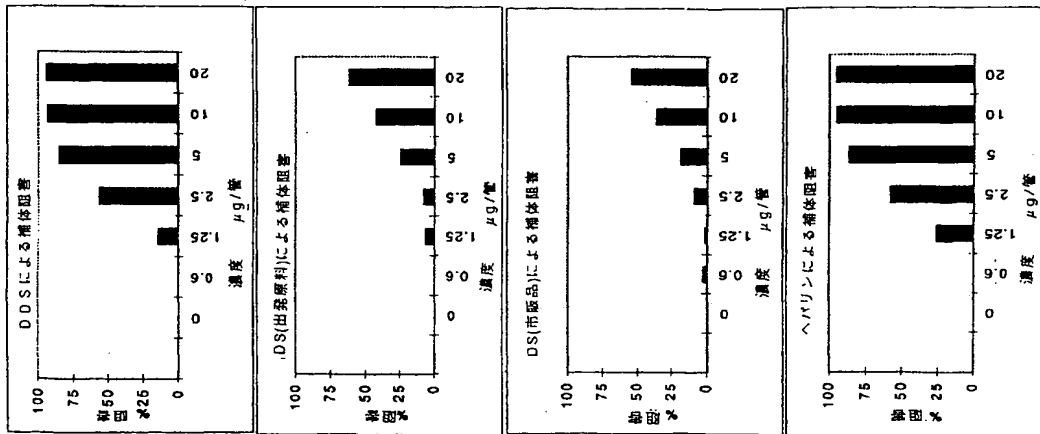
ルトンとの間である請求項59記載の方法。

61. 該組成物が、約25と約125 μ gとの間の範囲内の抗IIa活性を有し

FIG. 3



- ている請求項59記載の方法。
62. デルマタン硫酸の陽イオン対イオンがナトリウムである請求項59記載の方法。
63. デルマタン硫酸がアンモニウム、バリウム、カルシウム、銅、鉄、リチウム、およびカリウムよりなる群から選択された陽イオン対イオンを有する請求項59記載の方法。
64. 組成物が天然のデルマタン硫酸の化学的硫酸化により調製されたものである請求項59記載の方法。
65. 組成物が完全化学合成により調製されたものである請求項59記載の方法。
66. 天然のデルマタン硫酸が天然起源の精製されたものより単離されたものである請求項64記載の方法。
67. 該組成物がデルマタン硫酸の不均一調製物の電荷密度分画により精製されたものである請求項59記載の方法。
68. 投与工程が更に該組成物をin vivoで投与することを含む請求項59記載の方法。
69. 投与工程が更に該組成物を非経口的に投与することを含む請求項59記載の方法。
70. 投与工程が更に該組成物を経口投与することを含む請求項59記載の方法。
71. (削除)



[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No. PCT/US 97/1750	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C08B37/00 C08B37/08 A61K33/00 A61K31/725	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED IPC 6 C08B A61K A61K	
Documents searched other than prior art documents are included in the fields searched	
Electronic data bases consulted during the international search (name of each base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category: Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant category	
X	FR 2 584 728 A (CHOAY S.A.) 16 January 1987 see page 1, line 26 - line 33 see page 2, line 15 - line 19 see page 4, line 4 - line 7 see page 8, line 18 - line 25 see page 12, line 20 - page 13, line 15 see page 18: example 6 see page 20 - page 21: example 10 -/-
Relevant to claim No. 1, 2, 4, 6, 8-11, 13, 15, 20-23, 25, 27, 49, 51-53, 55-57, 59-62, 64, 66	
D. Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: "A": document defining the general state of the art which is not prior art for the purposes of the international search "B": document published on or after the international filing date "C": document which may throw doubt on priority claim(s) or on the novelty of the invention "D": document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E": document which is not prior art for the purposes of the international search but which may be relevant to the interpretation of the claims	
Date of the actual completion of the international search: 19 November 1997	
Date of mailing of the international search report: 12/12/1997	
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 1, 8001 Zurich, Switzerland Tel.: +41 (0) 43 66 11 11 Fax: +41 (0) 43 66 11 11	
Authorized officer: Mazet, J-F	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Category 1		Category 2		Category 3		Category 4		Category 5	
Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
X	DE 31 24 384 A (VOSS HERBERT) 5 January 1983 see page 10 - page 11; example								
X	K. WAGASAMA ET AL.: "Chemical sulfation of preparations of chondroitin 4- and 6-sulfate and dermatan sulfate. Preparation of chondroitin sulfate E-like materials from chondroitin 4-sulfate" CARBOHYDRATES RESEARCH, vol. 158, no. 1, 1986, AMSTERDAM, NL, pages 183-190, XP00204712 see page 186, line 15 - line 29 see page 190, line 1 - line 17								
A	EP 0 554 898 A (SEIKAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 11 August 1993 see page 9, line 2 - line 5 see example 29 see page 31, line 1 - line 10								

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form PCT/ISA/210) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Category 1		Category 2		Category 3		Category 4		Category 5	
Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
FR 2584728 A	16-01-87	AU 607395 B	07-03-91	JP 6073102 A	15-03-94				
		AU 600986 A	15-01-87	AT 152736 T	15-05-87				
		DK 328886 A	13-01-87	AU 670921 B	08-08-96				
		EP 0214879 A	18-03-87	AU 3287893 A	12-08-93				
		JP 62027402 A	05-02-87	CA 2088831 A	06-08-93				
		US 5013724 A	07-05-91	CN 1075970 A	08-09-93				
		NONE		DE 69310396 D	12-06-97				
				DE 69310396 T	16-10-97				
				ES 2102537 T	01-08-97				
				HU 71625 A	29-01-96				
				US 5462976 A	31-10-95				

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form PCT/ISA/210) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	特許コード (参考)
A 6 1 P 43/00	1 1 1	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00	Q
(72)発明者	ブシャナン、マイケル アール、 カナダ国、エルズレイ 3ゼット2、オン タリオ ハミルトン、ケント ストリート 151		
(72)発明者	リンハート、ロバート ジェイ、 アメリカ合衆国、52440 アイオア7、アイ オア シティ、プラム ストリート 1422		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.